



TECHNICKÁ UNIVERZITA V LIBERCI
Fakulta mechatroniky, informatiky
a mezioborových studií



PŘÍPRAVA A CHARAKTERISTIKA VLÁKENNÉHO NOSIČE PRO NÁHRADU NERVOVÉ TKÁNĚ

Diplomová práce

Studijní program: N3942 - Nanotechnologie
Studijní obor: 3942T002 - Nanomateriály
Autor práce: **Bc. Ilona Krabicová**
Vedoucí práce: Ing. Věra Jenčová, Ph.D.





TECHNICAL UNIVERSITY OF LIBEREC
Faculty of Mechatronics, Informatics
and Interdisciplinary Studies



PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF THE SCAFFOLD FOR THE NERVE TISSUE ENGINEERING

Master thesis

Study programme: N3942 - Nanotechnology
Study branch: 3942T002 - Nanomaterials
Author: **Bc. Ilona Krabicová**
Supervisor: Ing. Věra Jenčová, Ph.D.



ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Ilona Krabicová**
Osobní číslo: **M15000213**
Studijní program: **N3942 Nanotechnologie**
Studijní obor: **Nanomateriály**
Název tématu: **Příprava a charakteristika vláknenného nosiče pro náhradu nervové tkáně**
Zadávající katedra: **Katedra netkaných textilií a nanovláknenných materiálů**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Vypracování rešerše na dané téma
2. Příprava scaffoldu: tažení vláken (PCL 80 tis.) metodou drawing, funkcionalizace vrstvou polypyrrolu
3. Charakteristika připraveného materiálu: morfologie, povrchové napětí, viskozita, mechanické vlastnosti, degradační chování, vodivost
4. Biologické testování scaffoldu s použitím lidských dermálních fibroblastů (NHDF)
5. Zpracování výsledků

Rozsah grafických prací: dle potřeby dokumentace

Rozsah pracovní zprávy: 40-60 dle potřeby

Forma zpracování diplomové práce: tištěná/elektronická

Seznam odborné literatury:

1. T. Ondarçuhu, C. Joachim: Drawing a single nanofibre over hundreds of microns, Europhysics Letters, 1998.
2. Laleh Ghasemi-Mobarakeh, Molamma P Prabhakaran, Mohammad Morshed, Mohammad Hossein Nasr-Esfahani, Hossein Baharvand, Sahar Kiani, SalemS Al-Deyab and Seeram Ramakrishna. Application of conductive polymers, scaffolds and electrical stimulation for nerve tissue engineering, J Tissue Eng Regen Med 2011;5: e17e35.
3. Freshney R. I. Culture of animal cells. 2010, ISBN 9780470528129.

Vedoucí diplomové práce:

Ing. Věra Jenčová, Ph.D.

Katedra netkaných textilií a nanovláknenných materiálů

Datum zadání diplomové práce: **26. března 2016**

Termín odevzdání diplomové práce: **15. května 2017**

prof. Ing. Zdeněk Plíva, Ph.D.
děkan



prof. RNDr. David Lukáš, CSc.
vedoucí katedry

V Liberci dne 26. března 2016

Prohlášení

Byla jsem seznámena s tím, že na mou diplomovou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, zejména § 60 – školní dílo.

Beru na vědomí, že Technická univerzita v Liberci (TUL) nezasahuje do mých autorských práv užitím mé diplomové práce pro vnitřní potřebu TUL.

Užiji-li diplomovou práci nebo poskytnu-li licenci k jejímu využití, jsem si vědom povinnosti informovat o této skutečnosti TUL; v tomto případě má TUL právo ode mne požadovat úhradu nákladů, které vynaložila na vytvoření díla, až do jejich skutečné výše.

Diplomovou práci jsem vypracovala samostatně s použitím uvedené literatury a na základě konzultací s vedoucím diplomové práce a konzultantem.

Současně čestně prohlašuji, že tištěná verze práce se shoduje s elektronickou verzí, vloženou do IS STAG.

Datum: 15. 5. 2017

Podpis:



Poděkování

Ráda bych tímto poděkovala všem, kteří umožnili vznik této práce. V první řadě bych chtěla poděkovat své vedoucí diplomové práce Ing. Věře Jenčové, Ph.D. za cenné rady, vstřícnost a trpělivost. Také bych ráda poděkovala Mgr. Kateřině Strnadové a Ing. Tereze Švarcové za trpělivost a čas, který mi věnovaly při konzultacích a práci v laboratoři. V neposlední řadě bych chtěla vyjádřit své díky rodině, která mne při studiu vždy podporovala.

Abstrakt

V dnešní době jsou stále nemoci a zranění, která medicína zatím nedokáže vyléčit, včetně poranění míchy. Tato práce se zabývá výrobou a charakteristikou nosiče, který by umožnil regeneraci míchy a pomohl tak obnovit její funkci. Konečný implantát by měl mít podobu hydrogelového válce, ve kterém jsou podélně inkorporovaná elektricky vodivá vlákna. Cílem práce je vyrobit jednotlivá orientovaná vlákna metodou drawing modifikovaná vodivou povrchovou vrstvou, popsat vlastnosti materiálu a otestovat jeho cytokompatibilitu.

Metodou drawing byla vyrobena jednotlivá orientovaná PCL vlákna a opatřena vrstvou polypyrrolu. Při charakterizaci materiálu byla měřena viskozita a povrchové napětí roztoku, z něhož byla vlákna vyrobena. Dále byla zkoumána morfologie PCL vláken, jejich pevnost v tahu a degradační chování, na vláknech s povrchovou vrstvou polypyrrolu byla měřena vodivost. Následně byla vlákna podrobena in vitro experimentům, jejichž součástí byl test metabolické aktivity buněk a fluorescenční mikroskopie, kterou bylo možné sledovat i morfologii buněk. Pro in vitro testy byly jako kontrolní vzorky použity také neorientované vrstvy vláken vyrobené metodou elektrospinning a jednotlivá orientovaná vlákna vyrobená z kopolymeru PLCL.

Výsledky ukázaly, že buňky na orientovaných vláknech modifikovaných povrchovou vrstvou polypyrrolu dobře proliferují a kopírují orientaci vláken. Tento vlákenný materiál by proto měl být dobrou oporou pro orientovaný růst nervových buněk a tedy vhodnou součástí nosiče pro regeneraci nervové tkáně. Jednotlivá orientovaná mikrovlákna mohou být klíčovým materiálem pro regeneraci míchy i nervové tkáně obecně.

Klíčová slova

míšňí léze, drawing, polypyrrol, tkáňové inženýrství, scaffold

Abstract

Nowadays, there are still diseases and injuries that medicine cannot cure, including spinal cord injuries. This work is focused on the production and characterization of the scaffold, which would allow regeneration of the spinal cord and help to renew its function. Scaffold should have a form of a hydrogel cylinder with incorporated oriented conductive fibres. The aim of the work is to produce by the drawing method individual oriented fibres, modify them by the conductive surface layer, describe the properties of the material and test the cytocompatibility of the fibres.

Individual oriented PCL fibres were produced by the drawing method and they were modified with a polypyrrole layer. When characterizing the material, the viscosity and surface tension of the polymer solution were measured. In addition, the morphology of the fibres, their tensile strength and degradation behaviour were studied, on the polypyrrole-coated fibres the conductivity was measured. The fibres were subjected to in vitro experiments, including cell viability test and fluorescent microscopy, which shows the cell morphology. For in vitro tests were used also fibres with random orientation and individual PLCL oriented fibres.

The results showed that cells on polypyrrole-coated oriented fibres proliferate well and they copy the orientation of the fibres. The fibrous material should be a good support for orientated nerve cell growth and therefore a suitable part of the scaffold for nerve tissue regeneration. Individual oriented microfibres can be a key material for nerve tissue regeneration and cure for the spinal cord injury.

Key words

spinal cord injury, drawing, polypyrrole, tissue engineering, scaffold

Obsah

Úvod	12
Teoretická část.....	13
1 Nervová soustava.....	13
1.1 Nervové buňky.....	13
1.2 Mícha.....	14
1.2.1 Poškození míchy	15
2 Tkáňové inženýrství a regenerativní medicína	18
2.1 Vybrané materiály používané v tkáňovém inženýrství	18
2.1.1 Polykaprolakton (PCL).....	18
2.1.2 Kopolymer kyseliny polymléčné a polykaprolaktonu (PLCL)	20
2.1.3 Polypyrrol.....	21
2.1.4 Hydrogely	22
2.2 Regenerace nervové tkáně.....	22
2.2.1 Buněčná terapie	23
2.2.2 Použití hydrogelů	23
2.2.3 Použití vláknenných materiálů.....	24
2.2.4 Použití elektricky vodivých materiálů	26
3 Vybrané metody zvlákňování.....	29
3.1 Elektrospinning.....	29
3.2 Drawing	30
Experimentální část.....	33
4 Použité materiály	33
4.1.1 Příprava nosiče.....	33
4.1.2 In vitro testování	33
4.1.3 Zásobní roztoky, média.....	34
4.1.4 Přístroje a programy	34
5 Protokoly	36
5.1 Příprava roztoku polymeru.....	36
5.2 Výroba vláken metodou drawing.....	36
5.3 Modifikace vláken vrstvou polypyrrolu	37
5.4 Kultivace buněk.....	37
5.4.1 Rozmrazení	37
5.4.2 Pasážování.....	38

5.4.3	Výměna média	38
5.4.4	Nasazení buněk na vzorky	38
5.4.5	MTT test	39
5.4.6	Příprava vzorků na fluorescenční mikroskopii – phalloidin + DAPI.....	39
	Výsledky a diskuse	40
6	Příprava a charakteristika materiálu	40
6.1	Povrchové napětí roztoku	40
6.2	Viskozita roztoku	41
6.3	Morfologie vláken.....	41
6.4	Vodivost vláken	44
6.5	Pevnost v tahu.....	46
6.6	Degradační chování	48
7	Výroba a morfologie vlákenných vrstev	50
8	In vitro testy	53
8.1	Orientovaná vlákna (drawing) + lidské dermální fibroblasty.....	53
8.1.1	MTT test	53
8.1.2	Fluorescenční mikroskopie	55
8.2	Orientovaná vlákna (drawing) + 3T3 myší fibroblasty	57
8.2.1	MTT test	57
8.2.2	Fluorescenční mikroskopie	58
8.3	Mikrovlákna (elektrospinning) + 3T3.....	59
8.3.1	MTT test	59
8.3.2	Fluorescenční mikroskopie	60
8.4	Live cell imaging.....	61
	Závěr	62
	Seznam literatury	64
	Přílohy	68

Seznam zkratek

BSA	hovězí sérový albumin (Bovine serum albumin)
DAPI	4',6-diamidin-2-fenylindol
FBS	Fetal Bovine Serum
FDA	Food and Drug Administration
FITC	Fluorescein isothiokyanát
IPA	isopropylalkohol
MTT	3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazolium bromid
NC	negativní kontrola
NGF	nervový růstový faktor (Nerve Growth Factor)
NHDF	lidské dermální fibroblasty (Normal Human Dermal Fibroblasts)
PANi	polyanilin
PBS	fosfátový pufr (Phosphate Buffered Saline)
PCL	poly(ϵ -kaprolakton)
PEGDA	poly(etylen glykol) diakrylát
PGA	polyglykolid
PLCL	poly(laktid-co-kaprolakton)
PLGA	poly(laktid-co-glykolid)
PLLA	kyselina polymléčná
Ppy	polypyrrol
rpm	otáčky za minutu (revolutions per minute)
SEM	skenovací elektronová mikroskopie

Seznam příloh

A	Výsledky měření povrchového napětí roztoku.....	68
B	Výsledky testování pevnosti v tahu	70
C	Morfologie vláken PCL a PLCL vyrobených metodou drawing - histogramy	71
D	Morfologie vlákenných vrstev – histogramy.....	73
E	Snímky buněk NHDF na jednotlivých orientovaných vláknech.....	75
F	Obsah přiloženého CD	76

Úvod

Regenerace nervové tkáně je v dnešní době velmi diskutovaným tématem. Míšní léze vznikají nejčastěji následkem úrazu a mají pro život zasaženého jedince dalekosáhlé důsledky. Běžná medicínská praxe však zatím nemá řešení, které by umožnilo regeneraci míchy a návrat člověka po jejím poranění zpět do každodenního života bez trvalých následků. Proto se v této oblasti upíná naděje k oboru tkáňového inženýrství, jež by mohlo přinést řešení této problematiky. Kombinací nosiče z vhodného materiálu, biologicky aktivních látek a případně kmenových buněk se vytvoří implantát, jenž podpoří regeneraci okolní tkáně a obnovu její původní funkce.

Cílem této práce je testování komponent takového nosiče. Ten by měl mít podobu hydrogelového válce, uvnitř kterého jsou umístěna jednotlivá orientovaná vlákna s elektricky vodivou povrchovou vrstvou. Tímto implantátem se vyplní míšní léze a nosič svou strukturou i materiálovým složením podpoří regeneraci míchy. Hydrogel simuluje přirozené prostředí tkáně, vlákna mají napomoci orientaci axonů nervových buněk a vodivý povrch vláken má usnadnit přenos signálů mezi buňkami. Cílem experimentální části této práce je vyrobit a charakterizovat vláknennou část nosiče a otestovat její cytotoxicitu na lidské buněčné línii.

Teoretická část práce se zabývá shrnutím dané problematiky. Je zde popsána podoba nervové tkáně, problematika poranění míchy a některé výsledky výzkumu regenerace nervové tkáně popsané v literatuře. Přechodem k experimentální části je seznámení s vybranými materiály a metodami zvláknování používanými v tkáňovém inženýrství. Experimentální část práce se nejprve zabývá výrobou a charakterizací vláknenného materiálu, jenž je v poslední části práce podroben testování in vitro na buněčných liniích.

Teoretická část

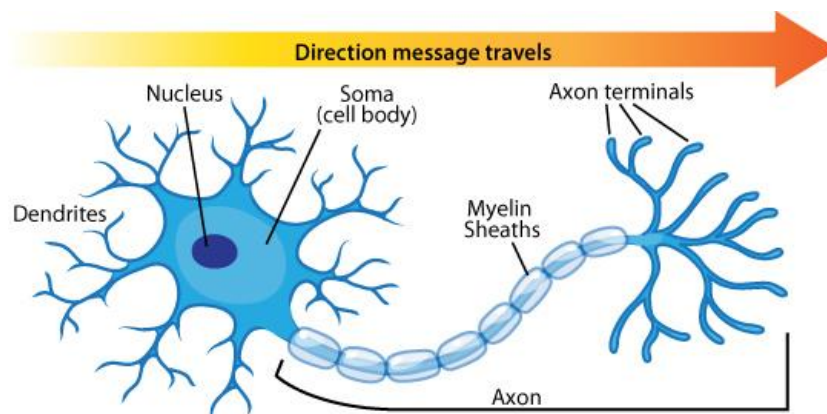
1 Nervová soustava

Nervová soustava se skládá z mozku a míchy (centrální nervová soustava) a periferních nervů. Tento systém řídí veškeré psychické, senzitivní a motorické funkce těla (Brodwin 2009).

V nervové soustavě se vyskytují dva hlavní typy buněk: nervové buňky a podpůrné buňky. Nervové buňky slouží k přenosu signálů po těle, podpůrné buňky pomáhají udržet a chránit strukturu a funkci nervových buněk (Brodwin 2009).

1.1 Nervové buňky

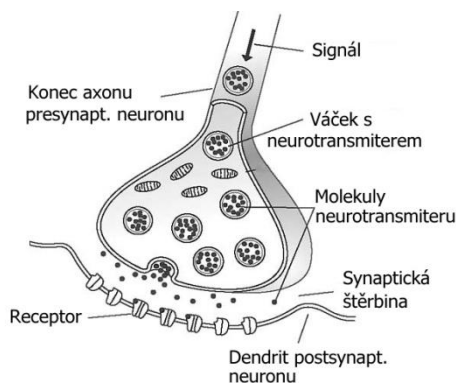
Nervová buňka (neuron) je základní jednotkou nervové tkáně. Neurony tvoří v těle síť, kterou se přenášejí signály mezi periferními nervy a centrální nervovou soustavou. Rozlišuje se více typů nervových buněk, jež se liší tvarem i velikostí. Nervové buňky se v průběhu života nedělí (Čihák et al. 2001).



Obrázek 1-1: Schematický obrázek neuronu: dendrity, jádro a tělo neuronu, axon s myelinovými pochvami a konečné větvení axonu. (ANON. 2011)

Velmi důležitou roli ve funkci neuronu hrají roli jejich výběžky – dendrity a axon (viz obrázek 1-1). Dendrity přijímají signály z ostatních nervových buněk do těla neuronu. Odtud je signál veden axonem k další nervové buňce, svalové buňce apod. Zatímco dendritů je na každém neuronu více, axon je pouze jeden. Délka axonu může být různá, od

velmi krátkých výběžků po výběžky s délkou přes 1 m. Průměr axonu je 0,05 – 20 μm , od určité tloušťky je axon obalen tzv. myelinovou pochvou (Čihák et al. 2001).

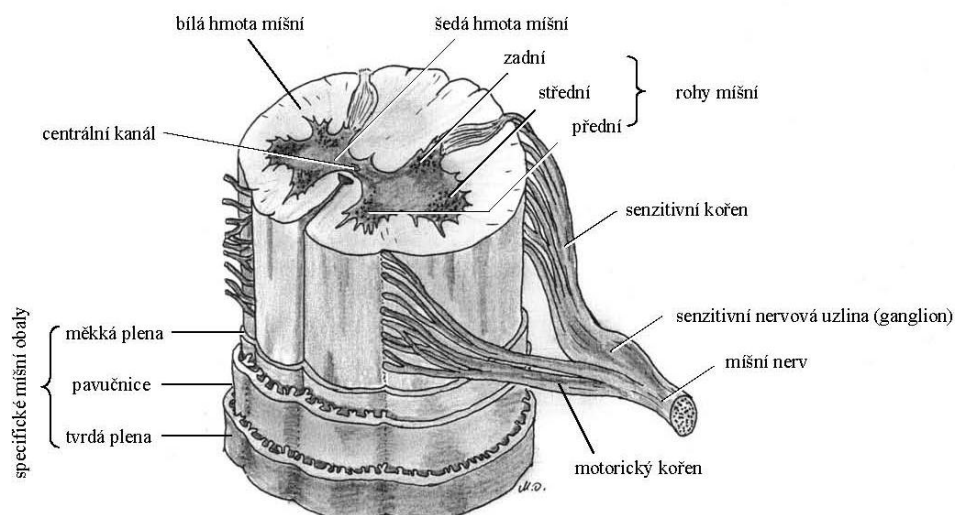


Obrázek 1-2: Schematický obrázek synapse a přenosu vzruchu mezi neurony (Špilková et al. 2015).

Vzruch v neuronu vzniká na základě elektrického, chemického nebo mechanického podnětu, který je přenášen buňkou dále přes axon až na konec ke kontaktnímu místu nervových buněk, tzv. synapsi (viz obrázek 1-2). Tam dochází k přenosu vzruchu na druhou buňku díky vylití mediátoru (chemický přenašeč signálu) do synaptické štěrby a podráždění dendritu další nervové buňky. Na tomto principu funguje chemická synapse, kromě ní existuje i přímý elektrický přenos nervového vzruchu. Celý proces přenosu signálu probíhá na základě změny elektrického membránového potenciálu, jež je způsobena transportem iontů přes membránu. Přenos vzruchů v nervových buňkách i mezi nimi (v synapsích) je vždy jednosměrný (Čihák et al. 2001).

1.2 Mícha

Mícha propojuje mozek se zbytkem těla. Má podobu válce nervové tkáně o délce 40-50 cm a šířce 10-13 mm. Je umístěna v páteřním kanálu (Čihák et al. 2001). Hřbetní mícha je dělena na segmenty: 8 krčních, 12 hrudních, 5 bederních, 5 křížových a 1 kostrční. Z každého segmentu vybíhají kořenová vlákna pro míšní nervy. Míšní nerv obsahuje motorická, senzitivní a vegetativní vlákna (Holibková et al. 2006).

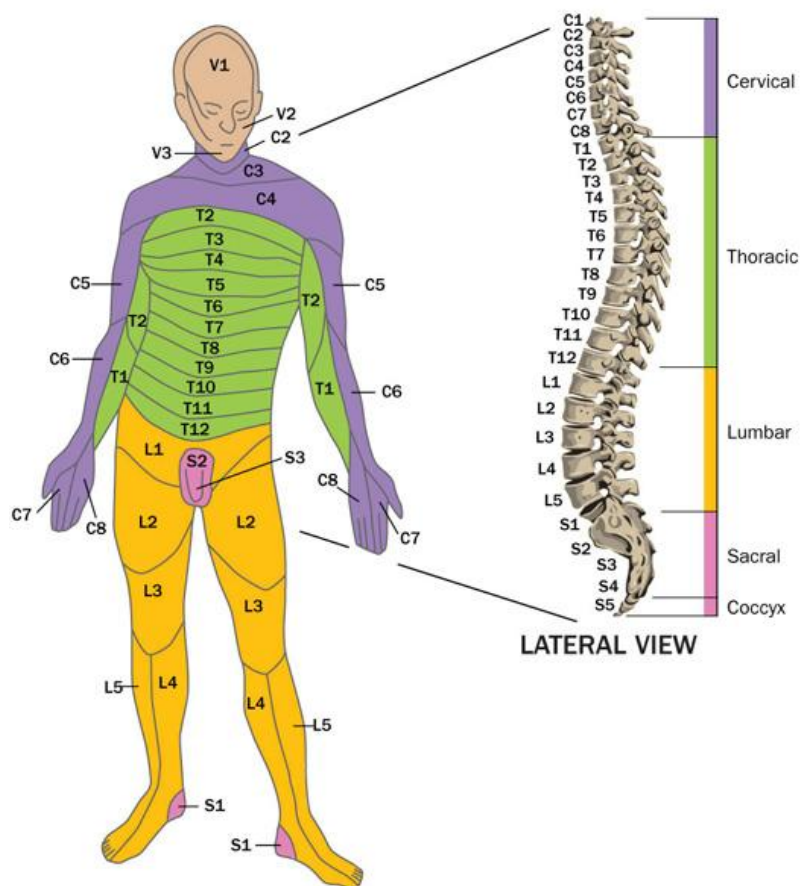


Obrázek 1-3: Schema stavby páteřní míchy (Orel 2011).

Struktura míchy je ukázána na obrázku 1-3. Uprostřed míchy nalezneme centrální kanál vyplněný mozkomíšním mokem. Ten je obklopen šedou hmotou míšní, jež má v průřezu tvar motýlích křídel, a dále k povrchu bílou hmotou míšní. V předních rozích šedé hmoty míšní se nacházejí motorické buňky, které nesou signály do příčně pruhovaného svalstva. V bílé hmotě míšní jsou umístěny provazce nervových buněk, tzv. (míšní) nervové dráhy. Míšní dráhy se dělí na dráhy senzitivní (ascendentní) a motorické (descendentní). Při poškození senzitivních drah dojde ke ztrátě vnímání bolesti a tepla (Holibková et al. 2006).

1.2.1 Poškození míchy

Nervové impulzy jsou přenášeny nervovými drahami mezi mozkiem přes míchu až do periferních nervů. Mezi jednotlivými obratli vybíhají provazce nervů, které ovládají tu kterou část těla (viz obrázek 1-4). Při přerušení nervových drah dochází ke ztrátě pohyblivosti a citlivosti svalů ovládaných poškozenou oblastí míchy (Brodwin 2009).



Obrázek 1-4: Od každého obratle vybíhají nervové provazce ovládající jednotlivé části těla. Na schematickém obrázku jsou označeny partie zasažené poškozením odpovídající části míchy. (ANON. 2017)

Míšní léze může být buď kompletní, při které dojde ke ztrátě veškerých motorických i senzitivních funkcí pod úrovní poranění, nebo částečná, kdy je zachována senzitivní a někdy částečně i motorická funkce těla i pod úrovní porušené míchy (Brodwin 2009; Young 2017).

Po přerušení míchy dochází ke zhoršování stavu následkem krvácení, otoku a nedostatku kyslíku v nervové tkáni. V místě traumatu vzniká zánět a dochází ke zjizvení. Z tohoto důvodu jsou podávány neuroprotektivní látky, které mají omezit šíření poškození (Brodwin 2009).

Míšní léze provází mnoho dalších komplikací, které ovlivňují život jedince s tímto zraněním. Kromě snížené pohyblivosti jsou s poškozením míchy spojené problémy s ovládáním vylučování, infekce močových cest, sexuální dysfunkce, autonomní hyperreflexie (zvýšení tlaku v důsledku podráždění periferních nervů), křeče, dekubity, bolesti, dýchací a srdeční obtíže a pochopitelně také psychické problémy (Brodwin 2009).

Lékařská péče se aktuálně zaměřuje na prevenci komplikací a rehabilitaci, aby zůstalo zachováno nejvíce možných funkcí těla. Výzkumy se zabývají stimulací růstu nervových buněk, transplantací nervových buněk a dalšími způsoby, jak vyléčit míšní poranění (Brodwin 2009).

2 Tkáňové inženýrství a regenerativní medicína

Tkáňové inženýrství je interdisciplinární obor, jenž využívá znalostí z různých oblastí vědy a techniky k regeneraci, zlepšení funkce nebo náhradě tkání a orgánů. Cílem tkáňového inženýrství je podpořit organismus, aby sám zregeneroval, a tento proces mu co nejvíce usnadnit. Prostředkem je tzv. scaffold (tkáňový nosič, „lešení“), neboli implantát kopírující strukturu mezibuněčné hmoty dané tkáně.

2.1 Vybrané materiály používané v tkáňovém inženýrství

Na nosič je kladena řada požadavků, hlavně musí být biokompatibilní a nesmí narušovat fyziologické procesy (Barnes et al. 2007). Dále je důležité, aby nosič podporoval svou strukturou i materiálem adhezi, růst a případně diferenciaci buněk a nevyvolával v těle nežádoucí reakce (Smith a Ma 2004; Barnes et al. 2007). Po úspěšné regeneraci chceme, aby v těle zůstala pouze nativní tkáň, proto je jedním z požadavků také biodegradabilita materiálu. Pro úspěšnou komercializaci nosiče musí být výroba scaffoldu snadná a variabilní, jelikož každá aplikace vyžaduje individuální vlastnosti (velikost, tvar, mechanické vlastnosti) nosiče podle typu dané tkáně (Barnes et al. 2007).

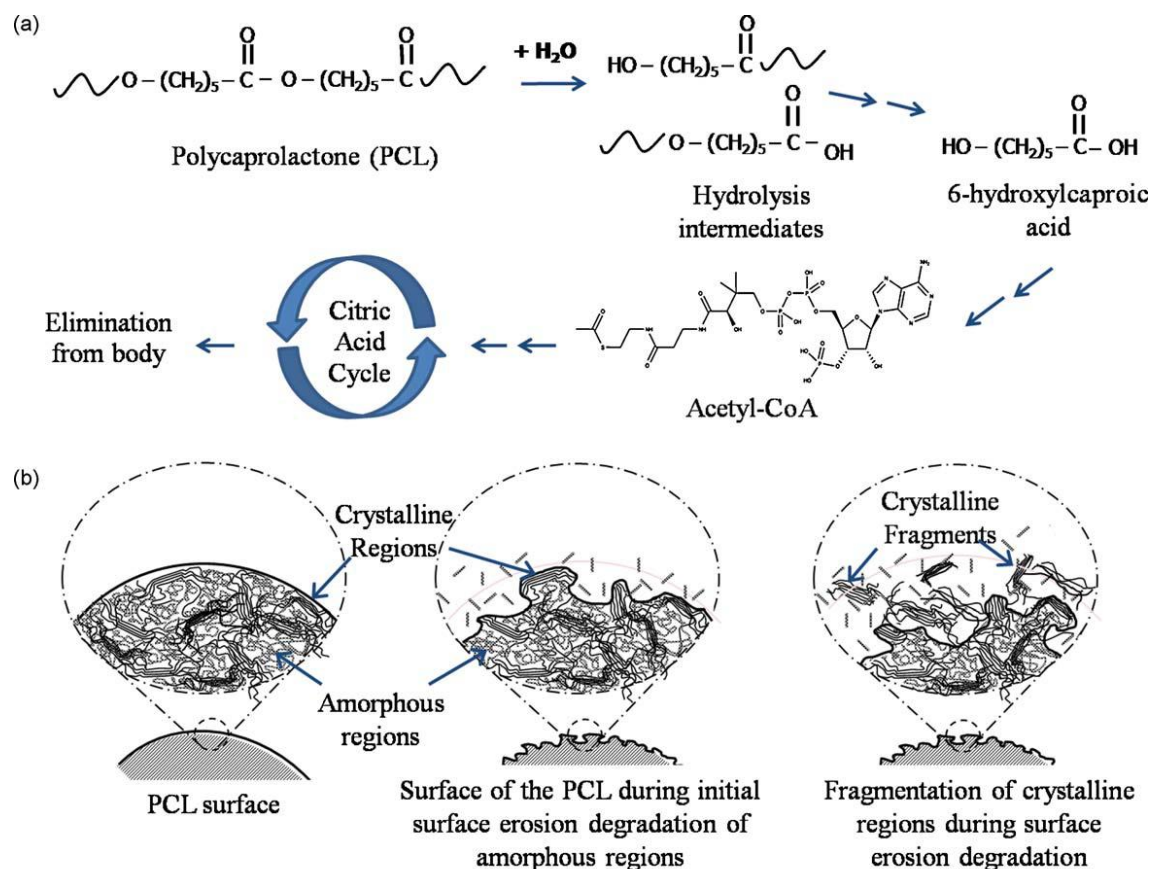
2.1.1 Polykaprolakton (PCL)

Polykaprolakton je syntetický semi-krystalický polyester připravovaný z cyklického monomeru ϵ -kaprolaktonu polymerací za otevření cyklu (Woodruff a Hutmacher 2010). Teplota skelného přechodu je -60°C a teplota tání se pohybuje v rozmezí $59-64^{\circ}\text{C}$ (Hayashi 1994; Woodruff a Hutmacher 2010). Polykaprolakton má malou pevnost v tahu (cca 23 MPa), ale vysokou hodnotu protažení při přetrhu (až 700%) (Nair a Laurencin 2007).

PCL je hydrofobní polymer. Rozpustný je např. v chloroformu, dichlormethanu, benzenu, toluenu, cyklohexanonu. Špatně rozpustný je v acetonu, 2-butanonu, ethyl acetátu, dimethylformamidu a acetonitrilu, nerozpustný např. v alkoholu, diethyl etheru, petroleum etheru (Coulembier et al. 2006; Woodruff a Hutmacher 2010).

Degradace PCL probíhá hydrolýzou esterové vazby (obrázek 2-1). Při tomto procesu však vznikají kyselé produkty, což může vést k zánětlivým reakcím organismu.

PCL kompletně degraduje během 2-4 let od implantace v závislosti na počáteční molekulové hmotnosti – s rostoucí molekulovou hmotností roste i doba potřebná k degradaci (Woodruff a Hutmacher 2010).



Obrázek 2-1: Schéma degradace PCL - (a) PCL degraduje hydrolyzou přes kyselinu 6-hydroxylkapronovou a acetyl-CoA se dostává do citrátového cyklu a je vyloučen z těla; (b) eroze povrchu PCL při degradaci, nejprve degradují amorfní oblasti, následně se odlučují krystalické fragmenty (Woodruff a Hutmacher 2010).

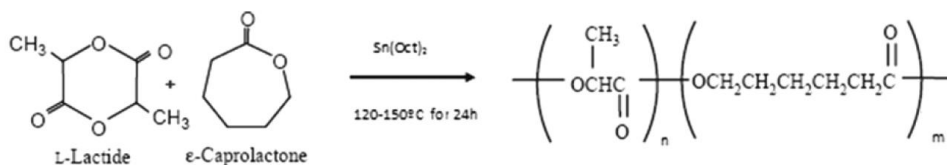
Díky svým mechanickým vlastnostem, postupné degradaci a snadnému zpracování nachází uplatnění například při kontrolovatelném uvolňování léčiv z matrice. Degradace PCL je pomalejší, než u PGA a PLA a jejich kopolymerů, proto je užíván pro dlouhodobé dodávání léčiv - aktivní přes 1 rok (Woodruff a Hutmacher 2010).

Dalšími důvody jeho častého používání je možnost přidání funkčních skupin – zvýšení hydrofility, adheze, biokompatibility, což vede k lepší reakci buněk na materiál. Kromě toho je PCL polymer schválený FDA (Food and Drug Administration), jeho uvedení do praxe je tedy méně komplikované, než při zavádění nového polymeru (Woodruff a Hutmacher 2010).

Za účelem změny nebo získání nových vlastností může být kaprolakton kombinován s jinými monomery (např. kyseliny polymléčné, etylenoxidu, polyethylenglykolu, polyvinylchloridu, polystyrenu, aj.) za vzniku kopolymerů. Takto lze mimo jiné například ovlivnit uvolňování enkapsulovaného léčiva (Woodruff a Hutmacher 2010) nebo zlepšit vlastnosti vstřebatelných šicích nití (Nair a Laurencin 2007).

2.1.2 Kopolymer kyseliny polymléčné a polykaprolaktonu (PLCL)

Polymery jako PLLA (poly(L-laktid)) jsou díky svým mechanickým vlastnostem nevhodné pro některé medicínské aplikace, kde jsou potřeba vysoce pružné biodegradabilní materiály. Proto jsou vyráběny blendy a kopolymery s materiály s vhodnějšími vlastnostmi, jako je například PCL. Jelikož jsou PLLA a PCL špatně mísitelné, je pozornost upřena spíše na jejich kopolymer. Použitím různého poměru složek lze ovlivnit mechanické vlastnosti, rychlost degradace a uvolňování léčiv (Fernández et al. 2012).



Obrázek 2-2: Schéma vzniku kopolymeru PLCL (Fernández et al. 2012).

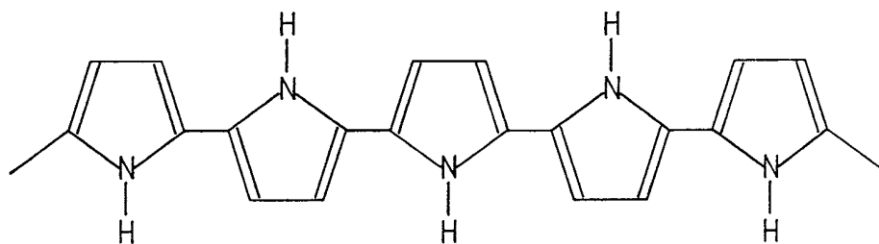
Kopolymer PLCL stejně jako jeho složky patří mezi degradabilní polyestery. Vzniká polymerací za otevření kruhu (viz obrázek 2-2) (Fernández et al. 2012), struktura a poměr monomerů závisí na podmínkách syntézy, poměru reagujících monomerů a použitém katalyzátoru (Fernández et al. 2013).

Náhodné kopolymery PLCL mají nižší podíl krystalické fáze, než PLCL s pravidelnější strukturou a rychleji podléhají degradaci. Obecně mechanické vlastnosti, degradační chování a další vlastnosti silně závisí na struktuře polymerního řetězce. S klesajícím podílem PLLA klesá také teplota tání a stupeň krystalinity kopolymeru (Fernández et al. 2013). Při zvyšujícím se obsahu PLLA v kopolymeru roste jeho modul pružnosti v tahu a klesá deformace při přetrhu (Fernández et al. 2012).

2.1.3 Polypyrrol

Polypyrrol patří do skupiny elektricky vodivých polymerů spolu s např. polyanilinem a polythiofenem. Díky snadné syntéze, cytokompatibilitě a vodivosti nachází polypyrrol uplatnění v oblastech od mikroelektroniky přes polymerní baterie po biosenzory, tkáňové inženýrství a neurální náhrady (Lee et al. 2009).

Polypyrrol je hydrofobní materiál nerozpustný v organických rozpouštědlech. Vodivost polypyrrolu závisí na mnoha faktorech, včetně způsobu přípravy, v případě polymerního filmu vyrobeného elektrochemicky je konduktivita 100 S/cm (Gerard 2002).



Obrázek 2-3: Schematický obrázek části polymerního řetězce polypyrrolu (Gerard 2002).

Polypyrrol je možné připravit elektrochemicky nebo chemicky. Každá metoda má své výhody i nevýhody. Elektrochemickou polymerací lze získat velmi tenký film polymeru, ale zachytává se přímo na elektrodě a jeho odstranění by bylo obtížné. Chemickou polymerací je možné vyrobit větší množství materiálu, jsou větší možnosti v oblasti modifikace materiálu, ale nevytvoří se tak tenká vrstva jako v případě elektrochemické přípravy. Podmínky polymerace mají velký vliv na výslednou morfologii polypyrrolové vrstvy, její mechanické vlastnosti i vodivost (Guimard et al. 2007).

O vodivé polymery je v dnešní době poměrně velký zájem. Výhodou je jejich biokompatibilita, vodivost a možnosti modifikací povrchu. Tyto vlastnosti mají velký potenciál využití v medicíně – např. ve tkáňovém inženýrství, protézách, biosenzorech, apod. Tyto polymery mají však i své nevýhody, mezi něž patří hydrofobní povrch a fakt, že nejsou biodegradabilní (Guimard et al. 2007). Není tedy jisté, jak by tělo reagovalo na dlouhodobý kontakt s polypyrrolem a bylo by vhodné zaměřit výzkum i na tuto oblast.

2.1.4 Hydrogely

Hydrogely jsou porézní hydrofilní polymerní materiály, které jsou v tkáňovém inženýrství používány díky jejich biokompatibilitě (Butcher et al. 2014) a 3D struktuře podobné mezibuněčné hmotě (Butcher et al. 2014; Bosworth et al. 2013). Navíc je možné hydrogel obohatit o bioaktivní látky (například růstové faktory) podporující životaschopnost buněk, případně stimulovat jejich diferenciaci, příliš však neovlivní orientaci růstu buněk (Butcher et al. 2014; Bosworth et al. 2013). Hydrogely mají využití také v kontrolovaném transportu léčiv a proteinů do tkání, mohou sloužit i k úpravě povrchu jiných materiálů a tím podpořit adhezi buněk (Slaughter et al. 2009).

Hydrogely mohou být přírodního původu, např. agarosa, chitosan, hyaluronan, fibrin, kolagen, ale také syntetického, např. polyetylenglykol, polyvinylalkohol, poly(2-hydroxyethylmetakrylát) (Slaughter et al. 2009). Navzdory mnoha kladným vlastnostem a velkému zájmu o tyto materiály, mají hydrogely špatné mechanické vlastnosti. Proto se poslední dobou věnuje pozornost jejich užití v rámci kompozitních materiálů, a sice v kombinaci s nanočásticemi nebo nanovláknky (Butcher et al. 2014; Bosworth et al. 2013).

2.2 Regenerace nervové tkáně

Výzkum na poli regenerace nervové tkáně, ať se jedná o periferní nervy nebo centrální nervový systém, je v dnešní době ve středu zájmu mnoha výzkumných týmů. To dokazuje množství vznikajících publikací. Za účelem léčby nervového systému a poranění míchy je zkoumáno použití různých metod, např. použití terapie kmenovými buňkami, využití tkáňového inženýrství, tedy implantace nosičů z přírodních i syntetických materiálů, aplikace biologicky aktivních látek pro podporu buněčného růstu nebo léčiv, která zmírňují následky zranění (zjizvení tkáně, apod.). V mnoha případech je vhodná kombinace více typů materiálů, či přístupů, dojde-li k synergickému efektu např. použití biologicky aktivních látek, kmenových buněk a tkáňového nosiče.

V následujících podkapitolách budou představeny některé metody léčby popsané v literatuře. Některé postupy byly testovány in vitro, některé byly testovány na zvířatech.

2.2.1 Buněčná terapie

Po porušení míchy dochází v následujících dnech až týdnech k sekundárnímu poškození neuronů, jejich nekróze a apoptóze. Cílem buněčné terapie je prevence apoptózy a náhrada odumřelých buněk (Sahni a Kessler 2010).

Pro léčbu poranění míchy se zkoumá např. použití neurálních kmenových buněk, mesenchymálních kmenových buněk, embryonálních kmenových buněk, Schwannových buněk, indukovaných pluripotentních kmenových buněk (Silva et al. 2014). Vlastností kmenových buněk je snadná proliferace, schopnost sebeobnovy (při dělení vzniká jedna buňka identická s mateřskou a druhá, jež se diferencuje) a schopnost diferencovat se do různých buněčných typů (Sahni a Kessler 2010). To činí kmenové buňky jedinečnými, a proto jsou tolik využívány pro účely buněčné terapie.

2.2.2 Použití hydrogelů

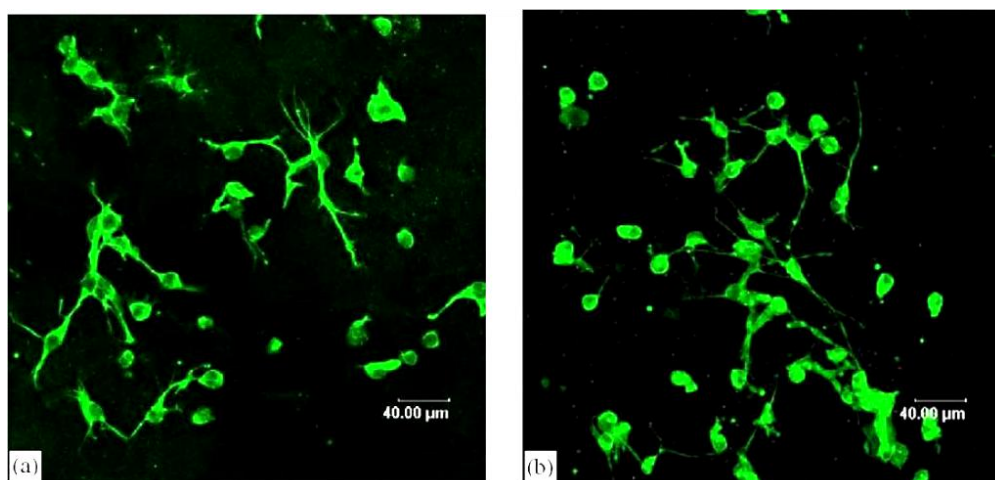
Hydrogely jsou hydrofilní 3D nanovláknenné struktury. Díky své struktuře a vysokému obsahu vody jsou hydrogely často využívány v modifikované podobě – např. osazené buňkami nebo s přidanými biologicky aktivními látkami.

Jedním z příkladů použití hydrogelu je injekce hydrogelu osazeného Schwannovými buňkami do místa poranění nervové tkáně (Moradi et al. 2012). Schwannovy buňky jsou schopné vytvořit myelinovou pochvu okolo periferních nervů, ale i reorganizovat gliovou jizvu a tím podpořit regeneraci axonů. Produkci neurotrofních faktorů podporují Schwannovy buňky prodloužení axonů (Tabesh et al. 2009). Moradi a kol. zkoumá regeneraci míšní léze u krys při použití peptidového hydrogelu BD PuraMatrix, při terapii Schwannovými buňkami a při aplikaci hydrogelu osazeného Schwannovými buňkami. Transplantované buňky měly v hydrogelu vyšší životnost, některé migrovaly do tkáně hostitele a některé zůstaly v graftu a přemostily lézi. Jak použití samotného hydrogelu, tak hydrogelu osazeného buňkami napomohlo regeneraci tkáně oproti použití samotných Schwannových buněk i kontrolnímu vzorku. Rozdíly mezi chováním testovaných skupin zvířat se začaly projevovat po 4 týdnech od vzniku léze (3 týdnech od aplikace léčby), kdy se začaly projevovat jako nejúčinnější kombinace hydrogelu se Schwannovými buňkami. Tento typ scaffoldu by tedy byl použitelný pro regeneraci míšní léze (Moradi et al. 2012).

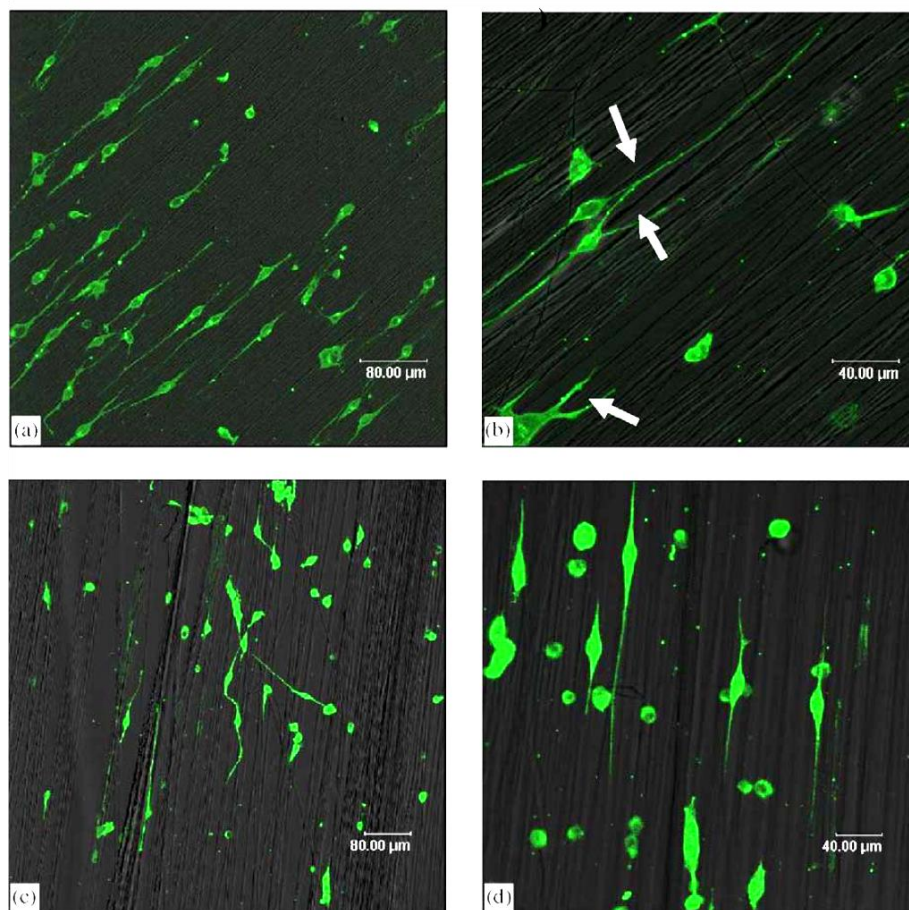
Další příklady použití hydrogelů jsou uvedeny také v následujících kapitolách, kde jsou hydrogely použity převážně ve scaffoldech složených z více druhů materiálů (např. hydrogel + vlákenná struktura v kapitole 2.2.3) nebo je podstatná také jiná vlastnost, než struktura (vodivý hydrogel v kapitole 2.2.4).

2.2.3 Použití vlákenných materiálů

Využitím orientovaných vláken pro regeneraci nervové tkáně se zabývá například práce Yang et al. (2005), kde autoři porovnávají chování kmenových buněk z myšího mozečku na PLLA vláknech, a sice rozdíl mezi mikro- a nanovláknami a mezi orientovanou a náhodnou strukturou vláken. Buňky adherovaly na všechny typy materiálu a axony kopírovaly orientaci mikro- i nanovláken (viz obrázek 2-5). Na náhodně uspořádaných vláknech k orientaci axonů nedošlo (viz obrázek 2-4). Naproti tomu diferenciaci buněk je dle autorů na orientaci nezávislá, ovšem závisí na průměru vláken. Větší podíl diferenciovaných buněk sledovali na nanovlákněch (80 %), než na mikrovlákněch (40 %) jak v případě orientovaných, tak neorientovaných vláken.

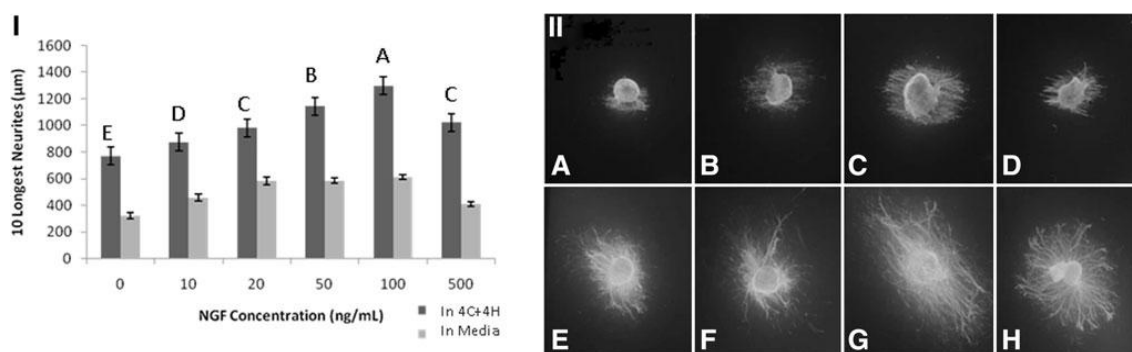


Obrázek 2-4: Snímky z mikroskopie nervových kmenových buněk na neorientovaných vláknech po dvou dnech kultivace: nanovlákná (a), mikrovlákná (b) (Yang et al. 2005).



Obrázek 2-5: Snímky z mikroskopie nervových kmenových buněk po 2 dnech kultivace na orientovaných vláknech: nanovláknna, zvětšení 200x (a); nanovláknna, zvětšení 400x (b); mikrovláknna, zvětšení 200x (c) a mikrovláknna, zvětšení 400x (d). (Yang et al. 2005)

Léčbou periferních nervů se zabývá např. práce Jin et al. (2013), jejímž cílem je zkoumat vliv hydrogelů kolagenu a hyaluronanu na prodlužování neuritů na scaffoldu z PLCL (poly-L-laktid-co-kaprolaktonových) nanovláken. Zároveň se zde autoři zabývají vlivem stimulace buněk nervovými růstovými faktory, jež jsou přidány do hydrogelu. Materiál byl testován in vitro a in vivo na krysách, cílem je regenerace sedacího nervu. Dle výsledků in vitro testů měla přítomnost orientovaných vláken pozitivní vliv na růst neuritů. Zároveň má vliv i použití hydrogelu, jelikož v porovnání s médiem byly neurity delší, nejvíce stimuluje růst kompozitní hydrogel kolagenu s hyaluronanem (v porovnání se samotným kolagenem, hyaluronanem a kompozitním hydrogelem s menší koncentrací obou složek). Přidání růstových faktorů dále znatelně stimuluje růst neuritů. Na obrázku 2-6 jsou znázorněny výsledky in vitro testů, vliv nervových růstových faktorů na růst neuritů buněk míšních nervových uzlin. V grafu i na snímcích imunofluorescence je vidět, že buňky kultivované v hydrogelu mají výrazně delší neurity, než buňky kultivované v médiu se stejnou koncentrací růstových faktorů.



Obrázek 2-6: Vliv nervových růstových faktorů (NGF) na růst míšních nervových uzlin. (I) Součet délek 10 nejdelších neuritů myších míšních nervových uzlin na nanovlákněném scaffoldu v médiu (světlé sloupce) a v hydrogelu (tmavé sloupce). U všech koncentrací růstových faktorů byl růst neuritů mnohem výraznější v hydrogelu. Písmena nad sloupci značí významné odchylky v délce. (II) Snímky imunofluorescence – míšní nervové uzliny pěstované na scaffoldu z orientovaných nanovláken s přidanými růstovými faktory. A-D: NGF v médiu (A: 0 ng/ml, B: 20 ng/ml, C: 100 ng/ml, D: 500 ng/ml); E-H NGF v hydrogelu (E: 0 ng/ml, F: 20 ng/ml, G: 100 ng/ml, H: 500 ng/ml) (Jin et al. 2013).

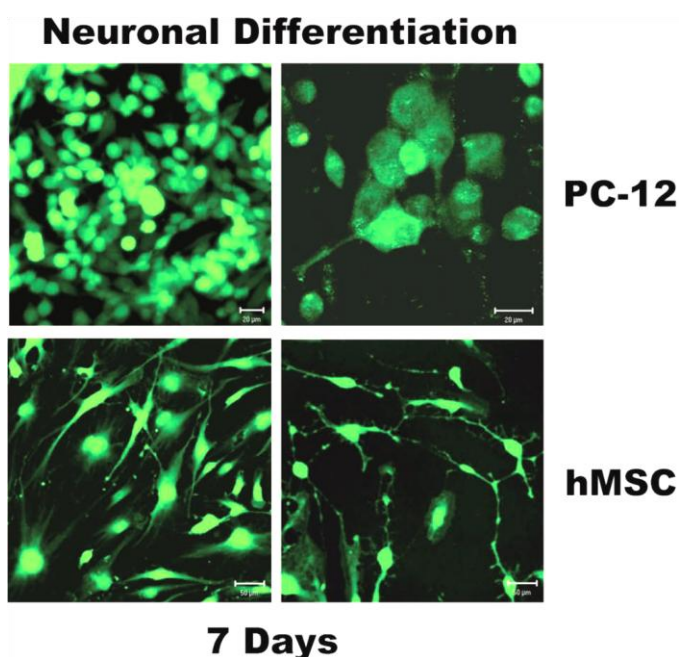
Po provedení testu *in vivo* bylo původní poškození nervu úspěšně přemostěno. Kompozitní hydrogel se osvědčil ve stimulaci růstu neuritů jak *in vitro*, tak *in vivo*. Neosvědčil se však jako nosič nervových růstových faktorů, pravděpodobně nezabraňuje degradaci růstových faktorů a uvolnilo se jen několik procent z původní dávky. Zřejmě z toho důvodu se ani v testu *in vivo* neprojevil vliv růstových faktorů na regeneraci sedacího nervu. V ideálním případě by měly být růstové faktory dlouhodobě uvolňovány z nosiče, který by je chránil před degradací (Jin et al. 2013).

2.2.4 Použití elektricky vodivých materiálů

Elektricky vodivé materiály se v oblasti tkáňového inženýrství uplatní především díky možnosti elektrické stimulace buněk. Tím mohou podpořit rychlejší regeneraci u tkání, pro něž jsou elektrické impulzy přirozené, např. nervová tkáň, svalovina nebo tkáň myokardu (Guarino et al. 2013).

Jednou z možností využití elektricky vodivých polymerů je jejich kombinace se síťovanými hydrogely, příkladem může být poly(hydroxymethakrylát), želatina, alginát, polyakrylamid, polyvinylpyrrolidon. Výrobou porézního scaffoldu z hydrogelu polyetylenglykol diakrylátu (PEGDA) s přidavkem polyanilinu (PANi) se zabývá práce Guarino et al. (2013). Autoři zkoumají vliv vodivého hydrogelu s makropóry na regeneraci nervové tkáně a růst neuritů. Se zvyšujícím se podílem PANi roste vodivost a je ovlivněna i morfologie hydrogelu. Materiál byl testován na dvou buněčných liniích: PC-12 a hMSC,

byla sledována diferenciace buněk v nervové buňky a jejich morfologie. U obou linií se po 5 dnech inkubace prokázal jako vhodnější 3% hmotnostní podíl PANi v hydrogelu oproti 1% podílu PANi. Morfologie buněk každé linie byla jiná (viz obrázek 2-7). Z výsledků je vidět, že materiál je pro buňky vhodný a dochází k růstu neuritů. Díky hydrogelovému základu nosiče je možné do struktury přidat biologicky aktivní látky, látky podporující adhezi buněk, růstové faktory, apod. Elektricky vodivá složka může taktéž podpořit adhezi a diferenciaci kmenových buněk do buněk nervových.

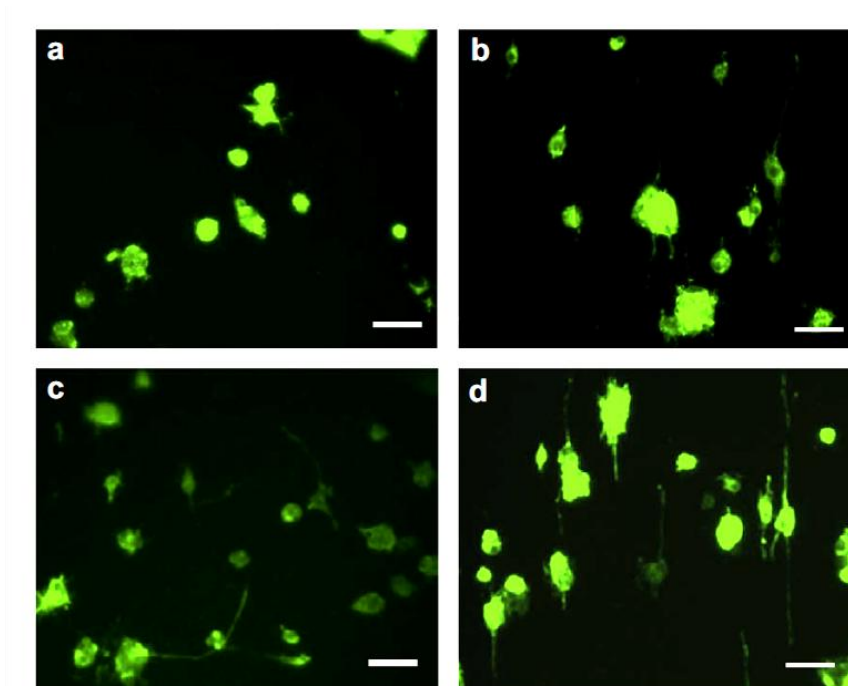


Obrázek 2-7: Snímky růstu neuritů po 7 dnech kultivace v 3% PANi/PEGDA scaffoldu s přidavkem nervového růstového faktoru (Guarino et al. 2013).

Elektricky vodivé polymery je možné použít i jako povrchovou vrstvu na vláknech, ať se jedná o vlákna uspořádaná nebo náhodně orientovaná. V článku Lee et al. (2009) jsou využita PLGA (polylaktid-co-glykolid) nanovlákna vyrobena metodou elektrospinning (orientovaná i neorientovaná) a modifikovaná povrchovou vrstvou polypyrrolu. Materiály byly testovány in vitro na dvou buněčných liniích (PC-12 a na neuronech z krysího embryonálního hippocampu), kromě cytokompatibility byly provedeny i experimenty s elektrickou stimulací buněk.

Polypyrrol dle výsledků neovlivňuje adhezi a viabilitu použitých buněk. V porovnání s neorientovanými vlákny rostou na orientovaných vláknech delší neurity a mají tendenci kopírovat orientaci vláken, vliv polypyrrolu na délku neuritů se neprokázal. Významný vliv na růst neuritů má však elektrická stimulace buněk při použití potenciálu 10 mV/cm (viz obrázek 2-8). Projevuje se zde synergický efekt typu materiálu a elektrické

stimulace, nejvýraznější prodloužení neuritů se prokázalo u elektricky stimulovaných buněk na orientovaných vláknech.

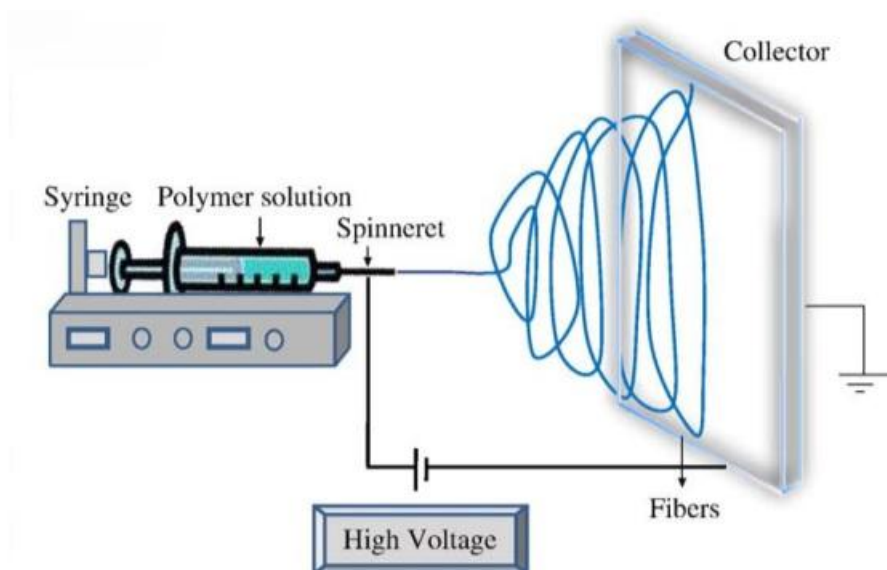


Obrázek 2-8: Snímky fluorescence elektricky stimulovaných buněk PC-12: (a) náhodně orientovaná vlákna s polypyrrolem bez stimulace; (b) orientovaná vlákna s polypyrrolem bez stimulace; (c) náhodně uspořádaná vlákna s polypyrrolem a el. stimulací 10 mV/cm; (d) orientovaná vlákna s polypyrrolem a el. stimulací 10 mV/cm (Lee et al. 2009).

3 Vybrané metody zvlákňování

3.1 Elektrospinning

Elektrospinning je technika využívající vysoké napětí k výrobě vláken z polymerního roztoku nebo taveniny (Sill a von Recum 2008). Touto metodou lze vyrábět vlákna o průměru od jednotek nanometrů do několika mikrometrů z přírodních i syntetických polymerů (Bhardwaj a Kundu 2010).



Obrázek 3-1: Schematické zobrazení elektrospinningu. Polymerní roztok je přiváděn do spinnerety (jehly) napojené na zdroj vysokého napětí. Vznikající vlákna jsou zachycována na uzemněný kolektor (Bhardwaj a Kundu 2010).

Na obrázku 3-1 je schematicky zobrazeno uspořádání aparatury pro elektrostatické zvlákňování. Ze stříkačky je do kapiláry (jehly) protlačován polymerní roztok. K jehle je připojen zdroj vysokého napětí, po jeho zapnutí se roztok nabíjí a z vytlačené kapky se vytváří tzv. Taylorův kužel, z něhož je k uzemněnému kolektoru unášeno vznikající nanovláknko (Sill a von Recum 2008). Vznik nanovláken je poháněn odpudivými silami v nabitém roztoku ve chvíli, kdy elektrické síly překonají povrchové napětí kapaliny (Bhardwaj a Kundu 2010).

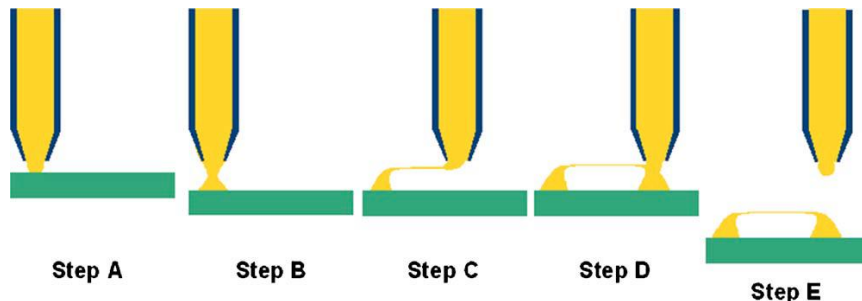
V závislosti na nastavení podmínek (např. vzdálenost mezi zvlákňovací elektrodou a kolektorem, viskozita polymeru) lze dosáhnout buď tvorby vláken, nebo kapek (tzv. elektrospraying) (Sill a von Recum 2008; Subbiah et al. 2005). Strukturu vláken lze ovlivnit mnoha faktory, např. dávkováním polymeru, použitým napětím, vzdáleností jehly

od kolektoru, koncentrací polymerního roztoku, jeho viskozitou, povrchovým napětím, vodivostí či rychlostí vypařování rozpouštědla (Subbiah et al. 2005).

Vláknenné materiály produkované touto metodou nacházejí díky svému velkému povrchu uplatnění například jako katalyzátory, tkáňové nosiče, nosiče léčiv, ochranné obleky nebo ve filtračních zařízeních (Subbiah et al. 2005).

3.2 Drawing

Drawing, nebo také tažení vláken z kapky polymeru, je metoda výroby jednotlivých vláken o průměru řádově nanometrů až mikrometrů (Bajáková et al. 2011). Princip je schematicky znázorněn na obrázku 3-2. Na podložku je nadávkována kapka polymerního roztoku (krok A), do kapky se namočí hrot (např. jehla, mikropipeta) a odtažením hrotu od kapky vzniká kapalně vlákno (kroky B, C). Díky velkému povrchu vlákna se rozpouštědlo velmi rychle odpařuje a polymer tuhne. Kontaktem hrotu s podložkou se přichytí druhý konec vlákna k podložce (krok D) a odtažením jehly se vlákno přetrhne (rychlým pohybem; krok E) nebo lze pokračovat tažením dalšího vlákna (Nain et al. 2006).

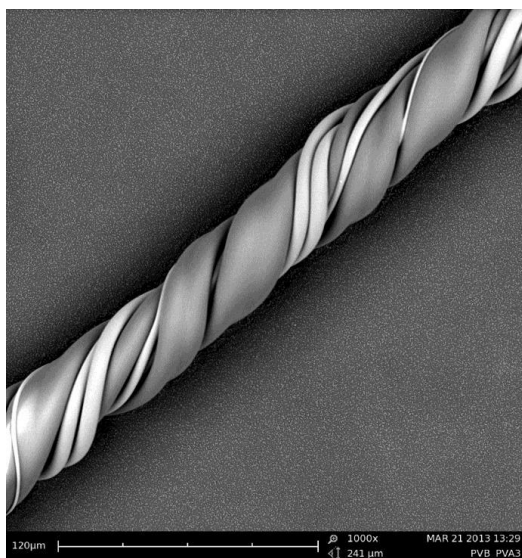


Obrázek 3-2: Princip tažení vlákna z kapky polymeru pomocí mikropipety v 5 krocích. Krok A: Dávkování polymerní kapky na podložku. Krok B: Vertikální odtažení pipety do požadované výšky definovanou rychlostí. Krok C: Horizontální pohyb pipety, dochází k tažení vlákna. Krok D: Přichycení druhého konce vlákna k substrátu. Krok E: Prerušení vlákna, resp. tažení nového vlákna. (Nain et al. 2006)

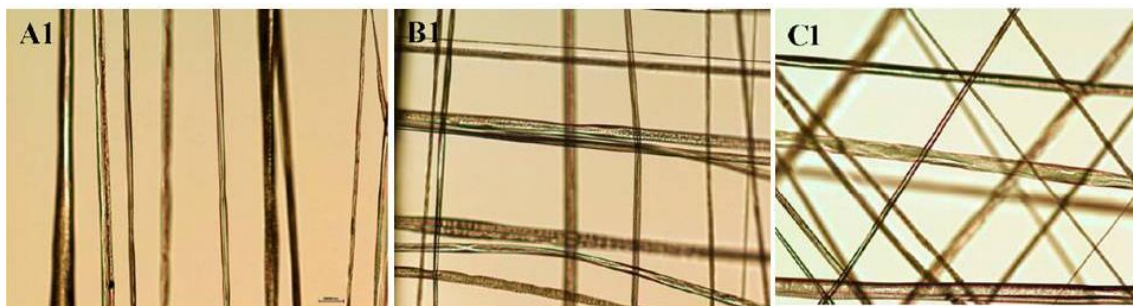
Tato technika je velmi variabilní. Pro výrobu vláken lze použít širokou škálu polymerů (např. polymethylmetakrylát, polykaprolakton, polyvinylalkohol, polyethylenoxid (Bajáková et al. 2011), polystyren (Nain et al. 2006), atd.), v závislosti na jejich vlastnostech je však nutné upravit podmínky zvláknování. Rozhodující u každého použitého polymeru je jeho molekulová hmotnost a koncentrace roztoku (Bajáková et al. 2011). Průměr vláken ovlivňuje dokonce i doba, která uběhne od vytlačení kapky do

natažení vlákna. Jelikož se rozpouštědlo z kapky průběžně odpařuje, vzroste během prodlevy viskozita roztoku a s ní i průměr vytaženého vlákna (Nain et al. 2006).

Kromě širokého výběru materiálů je výhodou drawingu i množství struktur, které lze touto metodou vytvořit. Díky tomu, že jsou vlákna tažena individuálně, můžeme během výroby přesně určit množství a délku vláken nebo například kombinovat vlákna z různých materiálů v přesně daném poměru (Stanislav a Bajáková 2013). Z vláken je možné následným zákrutem vytvořit přízi (mono- , či multikomponentní jako na obrázku 3-3) nebo vytvářet vrstvené struktury (např. mřížky, viz obrázek 3-4).



Obrázek 3-3: Příze z PVB a PVA vláken (Stanislav a Bajáková 2013)



Obrázek 3-4: Struktury vyrobené metodou drawing – rovnoběžná vlákna (A1), mřížka z kolmých vláken (B1), struktura z vláken tažených třemi směry (C1) (Havlíčková 2014)

Tažení vláken lze provádět ručně, což je ovšem velmi náročné a především nelze zaručit konstantní podmínky tažení u všech vláken (rychlost, trajektorie pohybu). Z tohoto důvodu byl na TUL vyvinut přístroj, tzv. mikromanipulátor, jenž zajišťuje mechanizaci procesu (Stanislav 2012). Mikromanipulátor je schopen tvořit individuální vlákna

pohybem definovanou rychlostí po předem stanovené trajektorii. Maximální délka vláken je omezena pracovní plochou stroje, ale také samonosností vlákna. Příliš dlouhé vlákno se po ztuhnutí vlastní vahou přetrhne, pokud není ihned uloženo na podložku. Zatím se podařilo vyrobit vlákna dlouhá několik desítek centimetrů (Stanislav 2012). Mikromanipulátor byl původně sestaven pro účel materiálového výzkumu (Stanislav a Bajáková 2013).

Individuální vlákna by mohla najít využití například v nanosenzorech, optických senzorech, nanoelektronice, biologických náhradách a mnoha dalších oblastech (Nain et al. 2006). Ve své práci se zabývám využitím vláken vyrobených metodou drawing v oblasti tkáňového inženýrství.

Experimentální část

4 Použité materiály

4.1.1 Příprava nosiče

FeCl ₃	Sigma - Aldrich
Chloroform	Penta
Kyselina p-toluensulfonová	Sigma - Aldrich
PCL (M _n =80 000)	Sigma - Aldrich
Purasorb PLC 7015	Corbion
Pyrrol	Sigma – Aldrich

4.1.2 In vitro testování

3T3 Swiss albino	ATCC
Azid sodný	Sigma Aldrich
BSA	VWR
DAPI	Sigma - Aldrich
DMEM	Lonza
FBS	Biosera
FBM	Lonza
FGM-2 Single Quots	Lonza
Glutaraldehyd	Sigma - Aldrich
KCl	Analytika
KH ₂ PO ₄	Analytika
Lipáza z Pseudomonas cepacia	Sigma Aldrich
MTT	Amresco
Na ₂ HPO ₄	Analytika
NaCl	Analytika
NHDF	Lonza
Phalloidin - FITC	Sigma - Aldrich
Triton™ X-100	Sigma - Aldrich
Trypsin	Biosera
Penicillin - Streptomycin - Amphotericin B	Lonza

4.1.3 Zásobní roztoky, média

Název	Složky	Další úpravy
DAPI	1 mg/ml v destilované vodě	
DMEM (médium)	90 ml DMEM 10 ml FBS 1 ml antibiotika	Práce ve sterilním prostředí, filtrace
FGM (médium)	500 ml FBM FGM-2 Single Quots	Práce ve sterilním prostředí
Phalloidin (FITC)	1 mg/ml v methanolu	
Glutaraldehyd	2,5 % v PBS	
MTT	2 g/l v PBS	Sterilizace přes stříkačkový filtr (póry velikosti 0,2 µm)
PBS	800 ml destilovaná voda 8 g NaCl 0,2 g KCl 1,44 g Na ₂ HPO ₄ 0,24 g KH ₂ PO ₄	Úprava pH = 7,4 Sterilizace v autoklávu
Triton	0,1 % Tritonu X-100 v 0,1% roztoku BSA v PBS	

4.1.4 Přístroje a programy

Spektrofotometr ELx808 (BioTek)
LUNATM Cell Counter, model L10001(Logos Biosystems)
Eclipse Ti-E (Nikon)
Vega3 SB - EasyProbe (Tescan)
Mikromanipulátor II (FS TUL)
Bio II Advance (Telstar)
CO2 inkubátor NB-203XL (N-Biotek)
Cirkulovaná digitální vodní lázeň (LabTech)
HAAKE™ RotoVisco™ 1 (Thermo Fisher Scientific)
PocketDyne (Krüss)
High Resistance meter 4339B (Hewlett Packard)
Labtest 2.010 (LaborTech)
VIP series MDF-U33V (Sanyo)

Quorum Q150ES (Quorum)

NIS Elements AR

Statistica

Microsoft Office Excel 2007

5 Protokoly

5.1 Příprava roztoku polymeru

Pro tažení vláken metodou drawing byly použity 12% roztoky PCL, resp. PLCL v chloroformu. Směs pro přípravu 10 g roztoku polymeru (1,2 g granulovaného polymeru a 8,8 g čistého chloroformu) byla v uzavřené vialce míchána na magnetické míchačce při pokojové teplotě dokud se granule úplně nerozpustily (cca 1 hodinu).

5.2 Výroba vláken metodou drawing

Vlákna byla vyráběna pomocí Mikromanipulátoru II. Celý proces je řízen programem v připojeném počítači, polymer je dávkován automaticky na obou koncích trajektorie tažení. Obsluha může pohybovat ramenem s připojeným zásobníkem polymeru (stříkačkou s kónickou jehlou) ve všech 3 osách a tím si nastavit ideální počáteční pozici. Jehla by se měla podložky zlehka dotýkat, nesmí však být zamezen průchod polymerního roztoku. V programu je možné nastavit následující parametry tažení: rychlost, zrychlení, dobu čekání v každé úvratí (důležité např. pro počáteční odpaření rozpouštědla z kapky), množství vláken na 1 mm, celkové množství vláken a souřadnice vyznačující trajektorii pohybu (zde se nastavuje i délka vláken). Parametry dávkování se nastavují ručně na dávkovací pumpě: tlak a doba stlačování pístu ve stříkačce. Dávkování je potřeba nastavit tak, aby polymer samovolně nevytékal, ale vytlačila se vždy jen malá kapka, ze které je taženo vlákno.

Zvlákňování probíhalo při pokojové teplotě, parametry tažení viz tabulka 5-1. Hotová vlákna byla upevněna na kónické držáky z polymethylmetakrylátu, jež usnadňovaly následnou manipulaci s vlákny (viz obrázek 5-1).



Obrázek 5-1: Upevnění vláken na držáky z PMMA

Tabulka 5-1: Parametry použité při výrobě vláken metodou drawing.

Počet vláken [1]	1000
Hustota vláken [1/mm]	100
Rychlost tažení [mm/s]	500
Zrychlení [mm/s ²]	500
Dráha [mm]	200
Tlak [bar]	0,75
Doba pulzu [s]	0,5
Teplota vzduchu [°C]	21 ± 2
Vlhkost vzduchu [%]	36 ± 1

5.3 Modifikace vláken vrstvou polypyrrolu

Vlákná byla ve spolupráci s Ing. Janem Lukáškem (NTI) modifikována povrchovou vrstvou polypyrrolu.

Nejprve byl přečištěn pyrrol destilací za sníženého tlaku ($t_v = 80\text{ °C}$ při $p = 100\text{ mbar}$), aby se odstranily produkty samovolné polymerace. Do misky s vloženými vzorky bylo odměřeno 300 ml methanolu s 347 μl pyrrolu. Roztok byl míchán 30 minut na magnetické míchačce při otáčkách cca 100 rpm. Ve 200 ml destilované vody bylo rozpuštěno 1,865 g chloridu železitého a 951 mg monohydrátu kyseliny p-toluensulfonové. Vodný roztok byl přidán k roztoku pyrrolu v methanolu a polymerace pyrrolu probíhala 3 dny při stálém míchání.

Po uplynutí stanovené doby byla vlákna vyjmuta z lázně, opláchnuta destilovanou vodou a poté methanolem. Tento postup byl zopakován třikrát, následovalo rozrušení shluků polypyrrolu ultrazvukem a další opláchnutí destilovanou vodou a methanolem. Po opláchnutí vzorků destilovanou vodou byly vzorky vysušeny v exsikátoru.

5.4 Kultivace buněk

5.4.1 Rozmrazení

Médium bylo předehřáté ve vodní lázni na 37 °C. Buněčná suspenze v kryozkumavce byla rychle rozmrazena ve vodní lázni a přenesena do plastové zkumavky

o objemu 15 ml. Do zkumavky bylo pomalu přidáno 5 ml média a obsah byl centrifugován po dobu 5 min při 1200 rpm. Médium bez buněk bylo odsáto a buňky byly resuspendovány v 10 ml čerstvě přidaného média. Následovalo stanovení počtu buněk v 1 ml suspenze a rozdělení suspenze do kultivačních lahví. Po doplnění média na stanovenou hladinu byly kultivační lahve uloženy do termostatu.

5.4.2 Pasážování

Pasážování se provádí při 70-80% konfluenci buněk. Z kultivační lahve bylo odsáto médium, poté byly buňky opláchnuty PBS pufrem. Po odsátí pufru byly do lahve přidány 2 ml trypsinu a lahev byla vložena na 2 minuty do termostatu. Jakmile se buňky uvolnily ze dna, bylo přidáno 8 ml média a buňky byly resuspendovány v roztoku. Poté bylo stanoveno množství buněk v suspenzi, jež byla rozdělena do nových kultivačních lahví s čerstvým médiem.

5.4.3 Výměna média

Médium se v kultivačních lahvích mění dle potřeby 2-3 krát týdně. Z lahve bylo odsáto použité médium, které bylo nahrazeno 15 ml čerstvého média předeřátého ve vodní lázni na 37 °C.

5.4.4 Nasazení buněk na vzorky

Nejprve bylo nutné sterilizovat testované materiály. V této práci byla použita sterilizace etylenoxidem při 37 °C a sterilizace ethanolem při pokojové teplotě po dobu 30 min. Po sterilizaci etylenoxidem bylo nutné nechat materiály odvětrat, aby se odstranila toxická rezidua. Před nasazením buněk byly vzorky opláchnuty pufrem PBS.

Příprava buněčné suspenze probíhala jako při pasážování (viz kapitola 5.4.2). Pomocí automatické počítací LUNA™ bylo stanoveno množství buněk v suspenzi. Pro orientovaná vlákna bylo aplikováno 10^5 buněk ke každému vzorku, pro testování planárních vrstev bylo nasazeno $5 \cdot 10^3$ buněk do každé jamky kultivační destičky.

5.4.5 MTT test

MTT test je kolorimetrická metoda stanovení viability buněk. Žlutý roztok 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromidu je v mitochondriích redukován na vodou nerozpustný formazan. Množství formazanu je úměrné množství a životaschopnosti buněk.

Pro každý testovací den byly použity 4 vzorky osazené buňkami, 1 vzorek jako negativní kontrola (tedy podrobený stejným podmínkám, ale bez buněk) a 4 jamky osazené buňkami, bez testovaného materiálu (pozitivní kontrola).

Vzorky byly v laminárním boxu přesunuty do nových kultivačních destiček. Ke každému vzorku bylo přidáno čerstvé médium a roztok MTT v poměru 3:1, a destičky se vzorky byly následně uloženy na 3 h do termostatu. Po 3 h byl roztok odsát a orientovaná vlákna sundána z držáků (aby se počítaly pouze buňky adherované na vláknech). Krystaly formazanu byly rozpuštěny ve 200 μ l izopropylalkoholu a absorbance výsledného roztoku byla změřena na spektrofotometru (při 570 nm a 650 nm). Výsledky byly zpracovány pomocí programu Excel.

5.4.6 Příprava vzorků na fluorescenční mikroskopii – phalloidin + DAPI

Vzorky byly přesunuty do čisté kultivační destičky a dvakrát promyty PBS. Následně byly fixovány roztokem glutaraldehydu po dobu 5 minut při 4°C. Po fixaci byly vzorky opět dvakrát propláchnuty PBS a permeabilizovány v 0,1% roztoku Tritonu 5 minut při pokojové teplotě. Na planární vzorky bylo použito 100 μ l roztoku, na jednotlivá vlákna v držácích 500 μ l roztoku. Vzorky byly opět opláchnuty PBS a barveny roztokem phalloidinu (1 μ l zásobního phalloidinu v 1 ml PBS) 30 minut při pokojové teplotě, poté opět několikrát opláchnuty PBS a barveny roztokem DAPI 5 minut při pokojové teplotě. Při práci s fluorescenčními barvivy bylo nutné pracovat za šera, aby nedošlo ke znehodnocení barev. Po obarvení byly vzorky naposledy dvakrát opláchnuty v PBS a připraveny ke sledování pomocí mikroskopu.

Výsledky a diskuse

6 Příprava a charakteristika materiálu

První fází byla příprava roztoku polymeru (viz protokol 5.1) a výroba orientovaných PCL vláken metodou drawing (viz protokol 5.2). Poté byla vlákna ve spolupráci s Ing. Janem Lukáškem (NTI) opatřena vrstvou polypyrrolu (protokol 5.3). Dále byly naměřeny vlastnosti použitého polymerního roztoku (12% roztok PCL). Charakteristika roztoku by měla pomoci při výrobě vláken z jiného polymeru. Znalost viskozity roztoku, který lze zvláknit, by měla pomoci při výběru molekulové hmotnosti a koncentrace roztoku dalších polymerů. Dodatečně byl pro experimenty použit i kopolymer PLCL (také 12% roztok v chloroformu), u něhož byly z důvodu časové a materiálové náročnosti provedeny jen některé charakteristiky. Výroba PLCL vláken probíhala stejně jako v případě PCL vláken.

6.1 Povrchové napětí roztoku

Povrchové napětí roztoku (PCL 12 % v chloroformu) bylo měřeno bublinkovou metodou. Do roztoku byla ponořena kapilára a přístroj změřil tlak, který byl potřeba k vytlačení bublinky vzduchu z kapiláry do roztoku. Bylo naměřeno celkem 30 hodnot (viz příloha A), které byly při zpracování zprůměrovány. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 6-1.

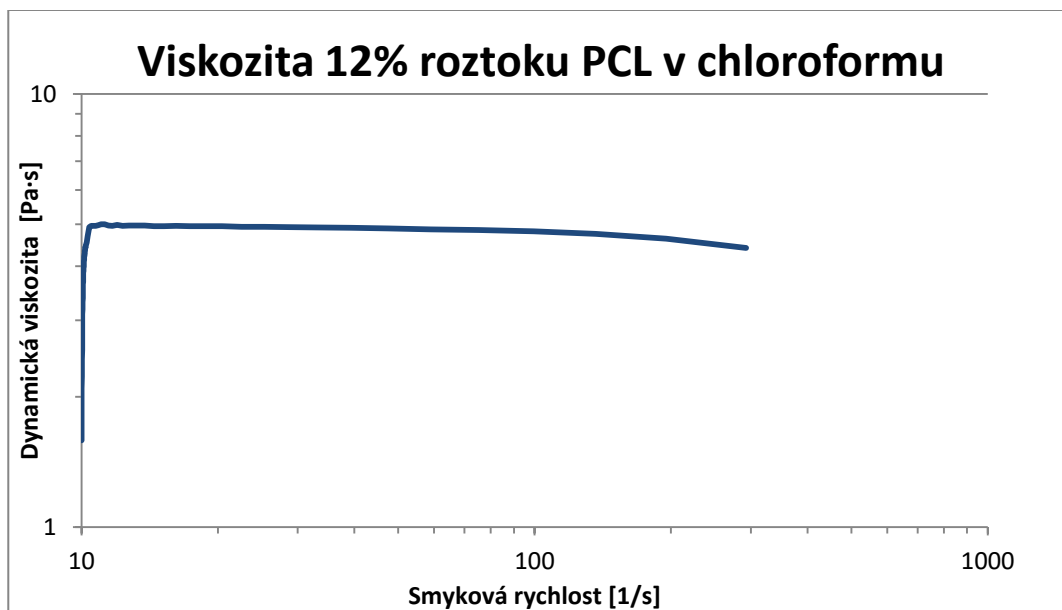
Tabulka 6-1: Výsledná hodnota povrchového napětí pro 12% roztoky PCL a PLCL v chloroformu.

	Povrchové napětí [mN/m]	Teplota [°C]
PCL	56 ± 3	$25,3 \pm 0,3$
PLCL	49 ± 6	$24,8 \pm 0,2$

Výsledná hodnota povrchového napětí pro 12% roztok PCL v chloroformu je (56 ± 3) mN/m a pro 12% roztok PLCL v chloroformu (49 ± 6) mN/m.

6.2 Viskozita roztoku

Viskozita roztoku (12% PCL v chloroformu) byla měřena pomocí souosých rotačních válců při lineárně rostoucí smykové rychlosti. Měřením byly získány 3 překrývající se křivky, z nichž jedna je uvedena v grafu 6-1. Při hodnotě smykové rychlosti $10,5 - 20,4 \text{ s}^{-1}$ a teplotě $t = 24,54 \text{ }^{\circ}\text{C}$ se dynamická viskozita ustálila na hodnotě $\eta = (4,97 \pm 0,02) \text{ Pa}\cdot\text{s}$. Kompletní data jsou přiložena na CD.



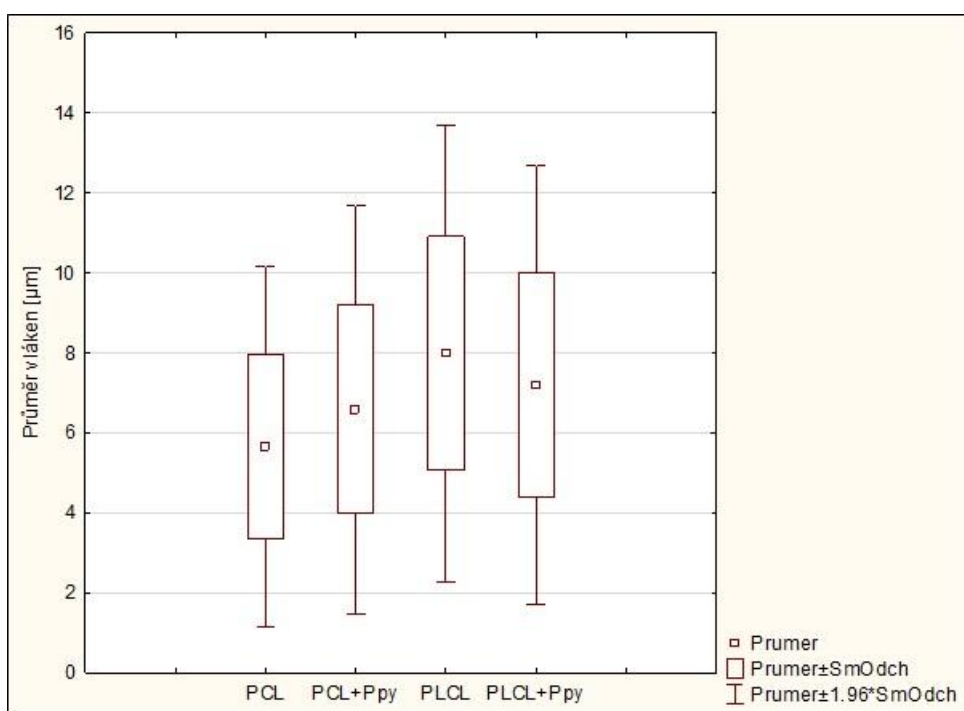
Graf 6-1: Závislost dynamické viskozity 12% roztoku PCL v chloroformu na použité smykové rychlosti.

6.3 Morfologie vláken

Pro zkoumání morfologie vláken byly vzorky pozlaceny 7 nm vrstvou zlata a byly pořízeny snímky pomocí skenovací elektronové mikroskopie. Následně byly měřeny průměry vláken pomocí softwaru NIS Elements AR. U každého vzorku byl naměřen soubor 100 vláken. Byla mezi sebou porovnávána vlákna PCL, PCL s vrstvou polypyrrolu, PLCL a PLCL s vrstvou polypyrrolu.

Tabulka 6-2: Naměřené hodnoty průměru vláken PCL, PCL s vrstvou polypyrrolu, PLCL a PLCL s vrstvou polypyrrolu.

	Průměr vláken [μm]	Minimální hodnota [μm]	Maximální hodnota [μm]
PCL	6 ± 3	1,83	13,36
PCL + Ppy	7 ± 3	1,47	15,63
PLCL	8 ± 3	2,22	15,8
PLCL + Ppy	7 ± 3	1,95	17,84

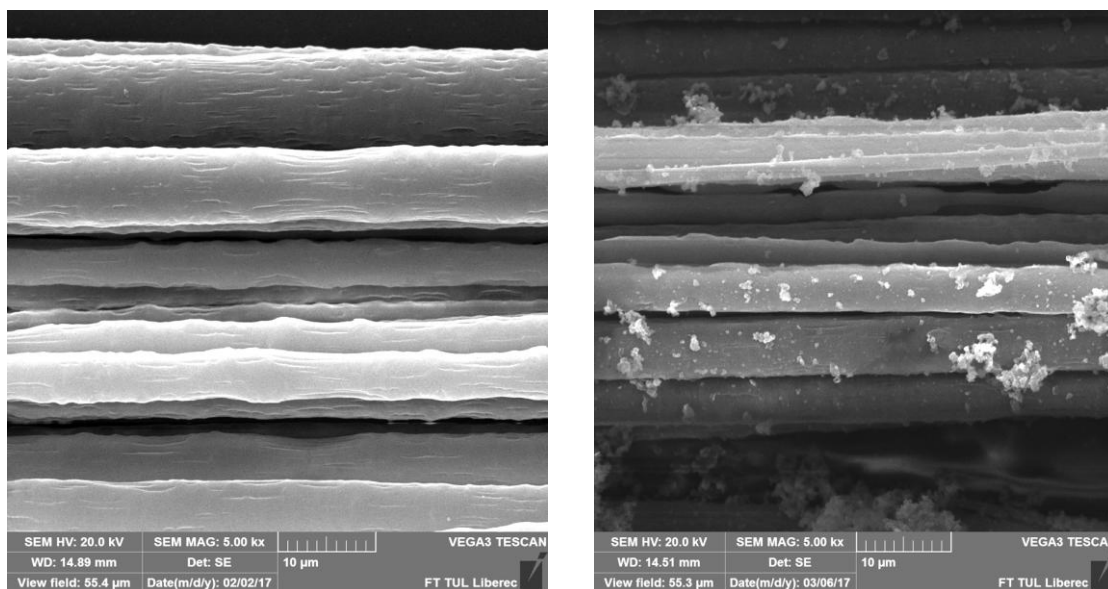


Graf 6-2: Krabicový graf průměrů vláken pro PCL, PCL s polypyrrolem, PLCL a PLCL s vrstvou polypyrrolu.

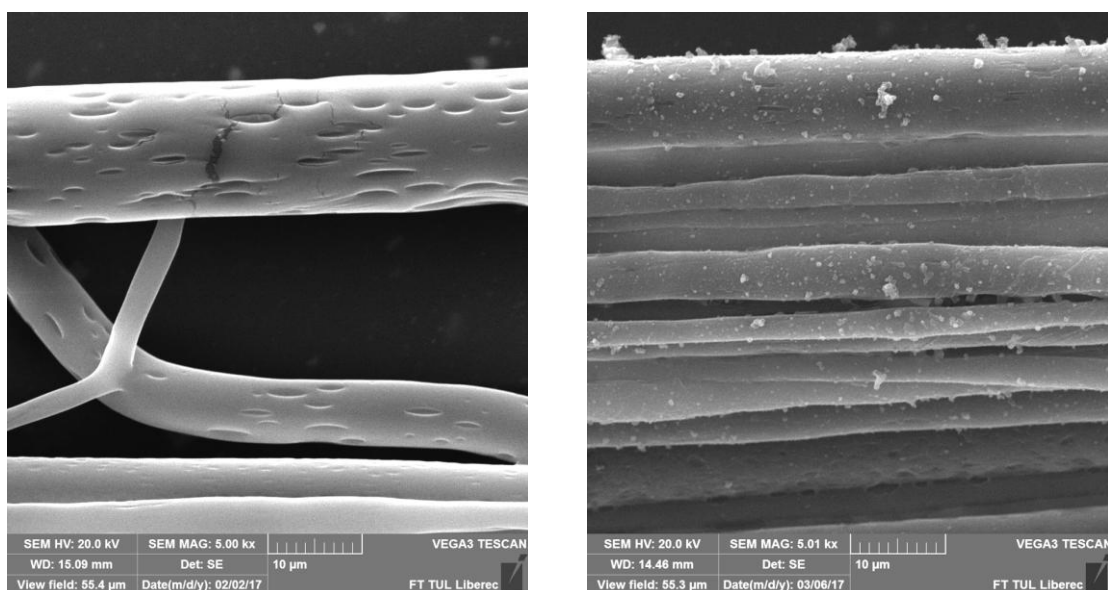
Výsledky měření jsou shrnuty v tabulce 6-2, graficky jsou znázorněny včetně směrodatných odchylek v grafu 6-2. Četnost průměru vláken je zobrazena v histogramech v příloze C.

Pro posouzení odlišnosti průměrů vláken byla provedena analýza rozptylu (ANOVA, Fisherův test). Statisticky významně se od sebe neliší pouze průměry vláken s vrstvou polypyrrolu, ve všech ostatních případech se průměry vláken liší. Pravděpodobně je to ale dáno širokým rozptylem průměrů vláken při výrobě metodou drawing. Vrstva polypyrrolu je pravděpodobně natolik tenká, že je její tloušťka

v porovnání s průměrem vlákna v řádech mikrometrů zanedbatelná (viz výsledky morfologie planárních vrstev v kapitole 7). Množství polypyrrolu na vláknech by se dalo kvantifikovat, např. vymytím PCL a porovnáním hmotnosti povrchové vrstvy a původních vláken. V takovém případě by bylo potřeba poměrně velké množství vláken, aby byly hmotnosti měřitelné.



Obrázek 6-1: Snímky SEM vláken vyrobených metodou drawing: PCL vlákna (vlevo) a PCL vlákna s vrstvou polypyrrolu (vpravo). Na vláknech se tvoří defekty: prohlubně na povrchu vláken vzniklé při tažení (vlevo) a shluky polypyrrolu při tvorbě povrchové vrstvy na vláknech (vpravo). Měřítka odpovídá 10 μm .



Obrázek 6-2: Defekty vznikají i na PLCL vláknech (vlevo), shluky polypyrrolu na vláknech PLCL + Ppy (vpravo). Měřítka odpovídá 10 μm .

Při zvlákňování metodou drawing vznikala za těchto podmínek téměř výhradně mikrometrová vlákna. Průměry vznikajících vláken by mohla ovlivnit změna podmínek – volba polymeru, rozpouštědla, změna atmosféry při zvlákňování, rychlosti tažení, koncentrace roztoku, změna molekulové hmotnosti polymeru, apod.

Při tažení vláken PCL vznikají na povrchu různé defekty a prohlubně, obzvláště u vláken s větším průměrem (viz obrázek 6-1). Zatím není jasný důvod vzniku těchto defektů. Mohly by být způsobeny únikem rozpouštědla ze středu vlákna ve chvíli, kdy povrch vlákna již zaschl. Tyto defekty by však nemusely být nežádoucí – mohly by podpořit růst buněk na materiálu.

Také u vláken PLCL vznikají při výrobě defekty (viz obrázek 6-2). Vlákná mají tendenci se shlukovat a slepovat a podobně jako u PCL vláken vznikají na povrchu prohlubně.

U vláken obou typů dochází při přípravě povrchové vrstvy k tvorbě shluků polypyrrolu. Ty by mohly ve větším množství působit škodlivě, případně se uvolňovat z materiálu. Pravděpodobně bude nutná další optimalizace procesu polymerace pyrrolu.

6.4 Vodivost vláken

Vodivost vláken PCL s vrstvou polypyrrolu byla měřena na Katedře materiálového inženýrství (KMI, FT TUL). K měření byly použity svorky upevněné v definované vzdálenosti na plastové podložce a připojené k měřicímu přístroji. Po upevnění 100 vláken byla sledována změna odporu mezi svorkami. Odpor se však po upevnění vláken nezměnil. Důvodů může být několik. Mohlo dojít k porušení povrchové vrstvy polypyrrolu při manipulaci s vlákny nebo při jejich sevření do čelistí. Upínací svorky byly oproti vláknům masivní s velkým stiskem, proto mohly vlákna deformovat a porušit povrchovou vrstvu. Další možností je, že při polymeraci vznikla kromě vodivé formy i nevodivá forma polypyrrolu a tudíž nešla vodivost vláken naměřit. V každém případě by bylo vhodné pokusit se naměřit vodivost vláken jiným způsobem.

Při druhém pokusu o měření vodivosti vláken (ve spolupráci s Ing. Lukášem Voleským, KMT) bylo 2000 vláken spojeno hliníkovou fólií (viz obrázek 6-3) a připojeno na měřicí přístroj. Ani v tomto uspořádání se nepodařilo vodivost vláken naměřit. Pravděpodobně je vrstva natolik tenká, že má vysoký odpor a přístroj nemá dostatečnou

citlivost. V budoucnu bude zřejmě potřeba měřit vodivost na vzorcích v podobě vrstvy, nikoli na samostatných vláknech, a s větší vrstvou polypyrrolu.



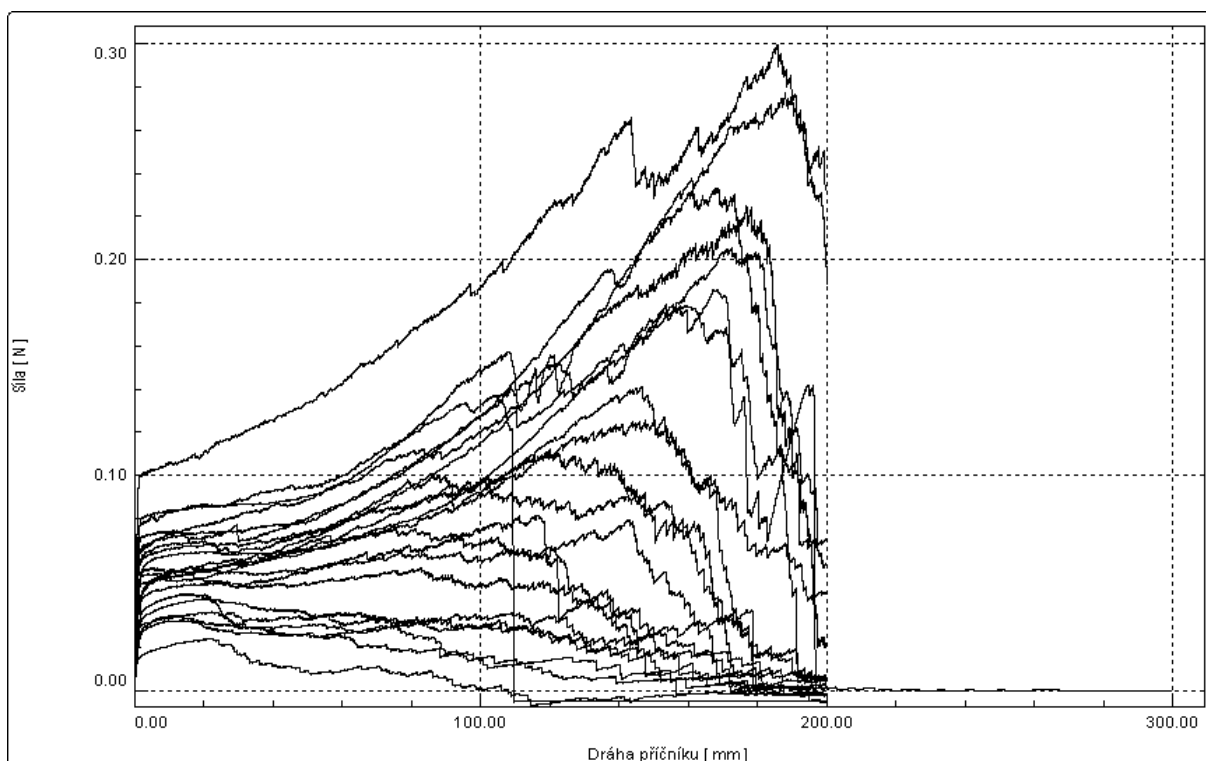
Obrázek 6-3: Upevnění vláken na hliníkovou fólii při měření vodivosti.

Je otázkou, jaký je vliv vodivých vláken v médiu pro kultivaci buněk. Jelikož je médium vlastně vodný roztok solí, bude mít pravděpodobně nižší odpor kapalina a při aplikaci elektrické stimulace buněk by proud tekł přednostně roztokem. Pak by polypyrrol působil jako vhodný substrát pro kultivaci buněk, ale efekt vodivosti by byl velmi omezený.

6.5 Pevnost v tahu

Pevnost v tahu byla měřena na svazcích PCL vláken po 200 vláčknech o počáteční délce 20 mm, rychlost posuvu čelistí byla 0,34 mm/s. Bylo provedeno celkem 22 měření, pro další vyhodnocení byla vyřazena vybočující měření a použito bylo 12 měření. Tabulka použitých dat je k dispozici v příloze A.

Pro výpočet pevnosti byl použit průměr vláken PCL (viz kap. 6.3) a hustota PCL $\rho = 1,145 \text{ g/cm}^3$.



Graf 6-3: Síla působící na svazek PCL vláken v závislosti na prodloužení vláken. V grafu je zobrazeno všech 22 měření, pro další zpracování byla vyřazena vybočující měření.

Tabulka 6-3: Statistika naměřených hodnot po vyřazení vybočujících měření, vypočítané hodnoty relativního prodloužení a pevnosti vláken.

	F_{\max} [N]	Prodloužení [mm]	Relativní prodloužení [%]	Pevnost vláken [N/tex]	Pevnost vláken [MPa]
Průměr	0,16	146,05	730,23	0,03	32,18
Směrodatná odchylka	0,06	29,72	148,62	0,01	12,37
Minimum	0,08	77,82	389,10	0,01	15,84
Maximum	0,28	188,16	940,80	0,05	55,45
95% IS – horní mez	0,20	162,86	814,32	0,03	39,18
95% IS – spodní mez	0,13	129,23	646,14	0,02	25,18

Pevnost testovaných PCL vláken je 30 ± 20 MPa. Výsledky měření se mezi sebou poměrně lišily, tomu odpovídá i velká směrodatná odchylka pevnosti vláken. Důvodem může být fakt, že vlákna vyrobená metodou drawing nejsou dloužená, polymerní řetězce ve vláknech jsou náhodně uspořádané a při namáhání na trhačím stroji se řetězce teprve uspořádávají. Každá série pak má mírně jiné mechanické vlastnosti. Rovněž jsme se při měření pohybovali ve velmi malých rychlostech a na prahu detekce přístroje, což má na měření také vliv.

Pevnost PCL vláken lze pro porovnání dohledat v literatuře, vybrané příklady viz tabulka 6-4. Vlákna vyrobená metodou drawing mají srovnatelnou pevnost s orientovanými mikrovláknými vyrobenými metodou elektrospinning. Na pevnost vláken má zjevně vliv také dloužení vláken. Je-li v tabulce uvedené rozmezí pevnosti, uvádějí autoři vlastnosti více typů vláken lišících se podmínkami zvláknování (rychlost otáčení kolektoru, koncentrace roztoku, stupeň dloužení).

Tabulka 6-4: Pevnost PCL vláken vyrobených jinými technikami zvlákňování.

Metoda výroby	Pevnost vláken [MPa]	Morfologie vláken	Reference
Elektrospinning	2,2 – 9,6	Orientovaná 350 – 550 nm	(Thomas et al. 2006)
Elektrospinning	4,7	Neorientovaná 600 nm	(Fujihara et al. 2005)
Elektrospinning	40	Orientovaná 1,4 μm	(Tan et al. 2005)
Gravitační zvlákňování (Gravity spinning)	1,8 – 9,9	147 - 190 μm	(Williamson a Coombes 2004)
	8,2 – 47,3	Dloužená za studena	

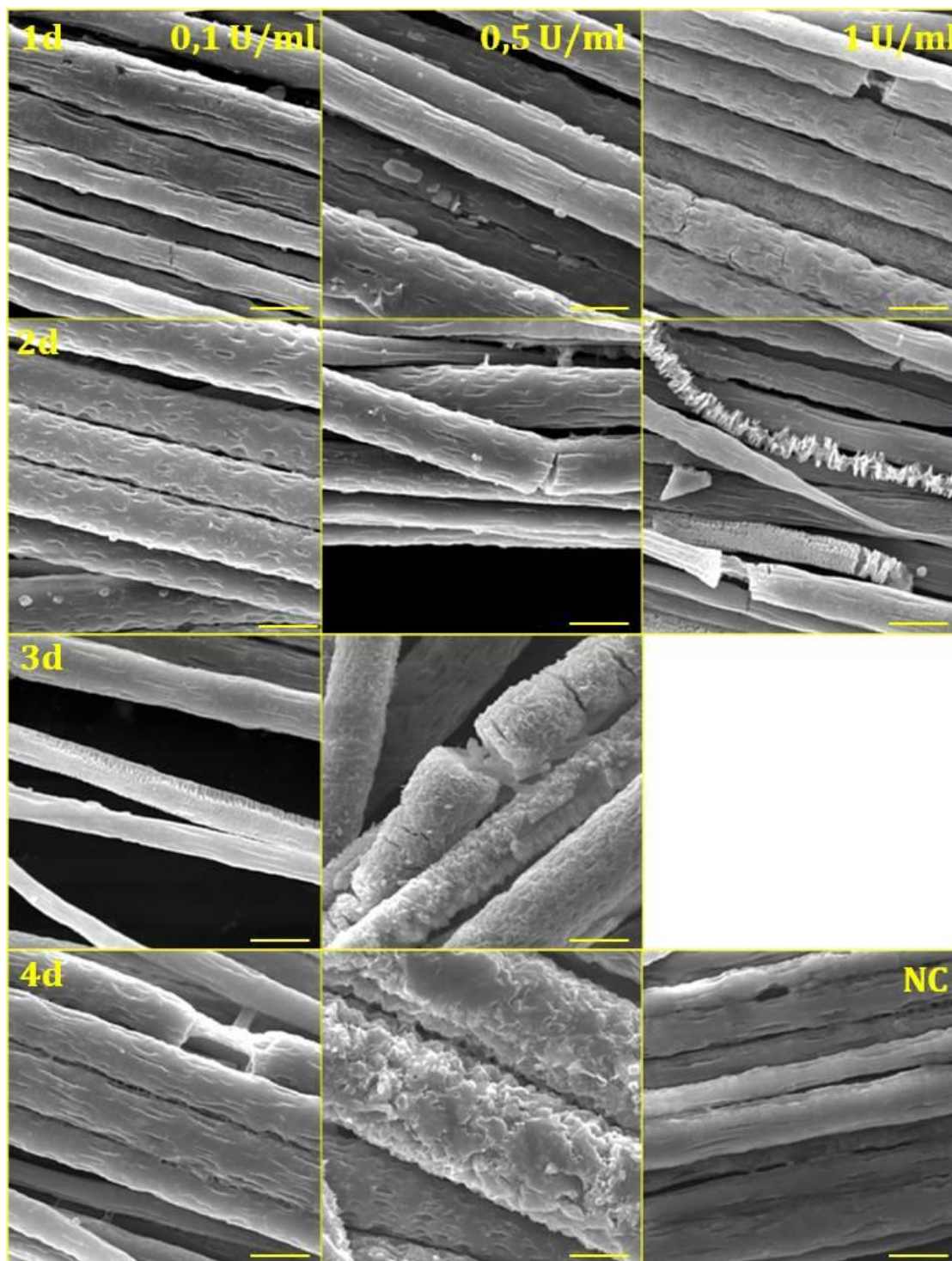
6.6 Degradací chování

Testy degradačního chování byly provedeny na orientovaných PCL vláknech, degradace byla katalyzována enzymaticky (lipázou). Experiment byl naplánován na 4 dny a byly porovnávány 3 koncentrace lipázy v roztoku: 1 U/ml, 0,5 U/ml a 0,1 U/ml. Jako zásobní roztok pro rozpuštění lipázy byl použit 0,02% roztok azidu sodného v PBS. Vzorky byly inkubovány v termostatu při 37°C a roztok enzymu byl každých 24 hodin vyměněn za čerstvý. Vzorky byly odebírány vždy po 24 hodinách, opláchnuty destilovanou vodou a vysušeny. Poté byly připraveny na elektronovou mikroskopii.

Změny morfologie vláken jsou uvedeny na obrázku 6-4. Při koncentraci lipázy 0,1 U/ml byla degradace pomalá, ke zřetelné erozi povrchu došlo až 3. testovací den. U ostatních koncentrací je degradace vláken výrazně rychlejší, u nejvyšší koncentrace došlo 3. testovací den již k úplné degradaci materiálu. Degradací chování se mezi jednotlivými vlákny liší, někdy dochází k tvorbě jakési mozaikové struktury na povrchu, jindy zůstanou vlákna celistvá a dojde ke ztrátě materiálu jen lokálně (vznikají trhliny, v některých částech zbývá z vlákna jen střed). Struktury vznikající při degradaci závisí pravděpodobně na rekrytalizaci polymeru během procesu degradace. Krystalické oblasti degradují pomaleji a vzniká krajková struktura povrchu. V konečné fázi degradace dochází ke „spékání“ vláken dohromady a úplnému rozpadu materiálu.

Pro účely dalšího testování degradačního chování by bylo vhodné zvolit koncentraci roztoku lipázy mezi 0,3 – 0,4 U/ml, aby se optimalizovala rychlost degradace

materiálu. K popisu chování vláken by mohly pomoci i testy krystalinity (např. diferenciální skenovací kalorimetrie), které by mohly pomoci objasnit morfologické změny vláken.

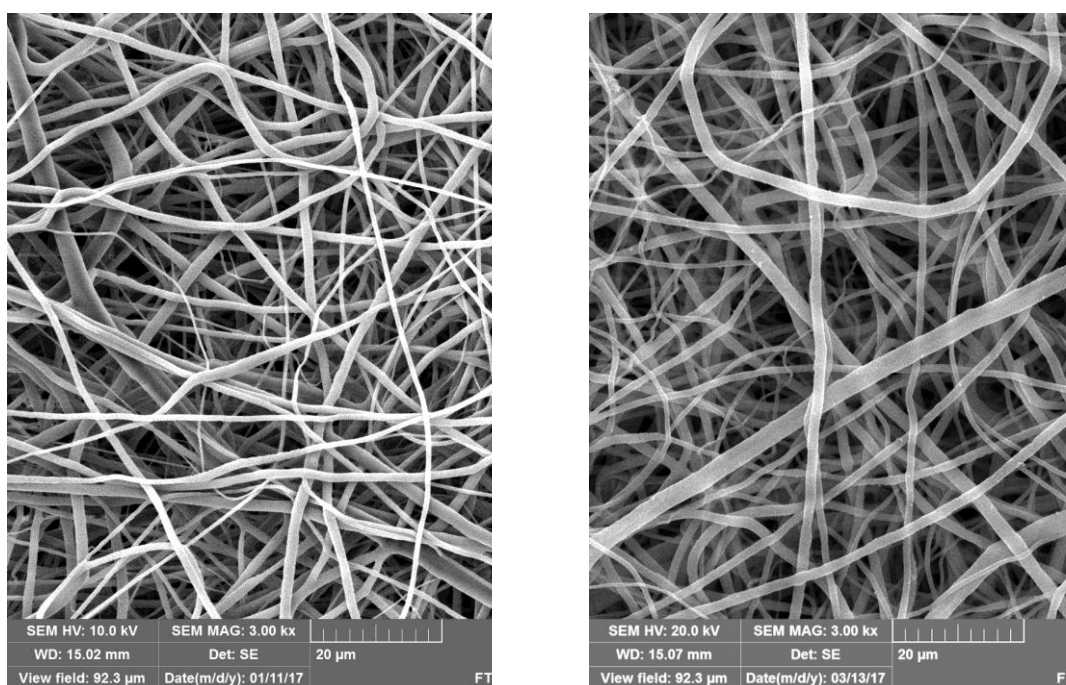


Obrázek 6-4: Snímky SEM degradace PCL vláken v roztoku lipázy. Ve sloupcích je koncentrace lipázy (0,1 U/ml; 0,5 U/ml; 1 U/ml) a v řádcích testovací dny (1., 2., 3., 4.). Je přiložen i snímek kontrolního vzorku inkubovaného v pufru bez lipázy (NC, pořízeno 4. testovací den). Měřítka odpovídá 10 μ m.

7 Výroba a morfologie vláknenných vrstev

Jako kontrolní vzorky byly pro in vitro testy použity planární vláknenné materiály s náhodnou orientací vláken. Materiály byly vyrobeny na přístroji Nanospider z 10% roztoku PCL o molekulové hmotnosti 80 tis. v rozpouštědlovém systému chloroform : ethanol : kyselina octová (poměr 8:1:1) a 10% roztoku PLCL ve stejném rozpouštědlovém systému. Hotové vrstvy byly opatřeny vrstvou polypyrrolu podle protokolu 5.3.

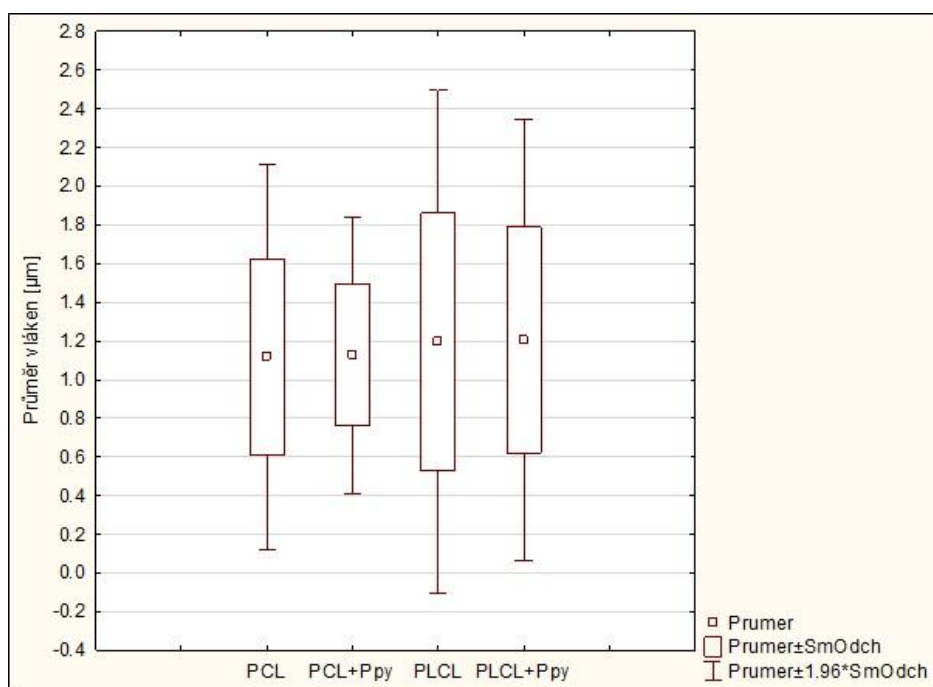
Stejně jako u vláken vyrobených metodou drawing byly i u planárních vrstev měřeny průměry vláken pomocí programu NIS Elements AR. K měření byly použity snímky SEM pozlacených materiálů (vrstva zlata 7 nm).



Obrázek 7-1: Snímky SEM vláknenných materiálů vyrobených metodou elektrosinning – vlákna PCL (vlevo) a vlákna PCL s vrstvou polypyrrolu (vpravo). Měřítka odpovídá 20 µm.

Tabulka 7-1: Naměřené hodnoty průměru vláken vyrobených metodou elektrosponing – PCL, PCL s vrstvou polypyrrolu, PLCL a PLCL s vrstvou polypyrrolu.

	Průměr vláken [μm]	Minimální hodnota [μm]	Maximální hodnota [μm]
PCL	$1,1 \pm 0,5$	0,35	2,64
PCL + Ppy	$1,1 \pm 0,4$	0,48	2,06
PLCL	$1,2 \pm 0,7$	0,35	3,09
PLCL + Ppy	$1,2 \pm 0,6$	0,49	3,79



Graf 7-1: Krabicový graf průměrů vláken vyrobených elektrostatičným zvlákňováním. Zkoumanými materiály jsou PCL, PCL s vrstvou polypyrrolu, PLCL a PLCL s vrstvou polypyrrolu.

Z výsledků měření průměru vláken je patrné, že vlákna vyrobená metodou elektrosponing jsou tenčí, než vlákna vyrobená metodou drawing. Pro porovnání průměru vláken u jednotlivých materiálů byla provedena ANOVA (Fisherův test), podle které se průměry vláken statisticky významně neliší.

Na vláknech vyrobených elektrostatičným zvlákňováním nejsou patrné defekty jako u jednotlivě tažených vláken, to by mohlo být způsobeno kromě použití jiné techniky i jejich menším průměrem.

Při přípravě polypyrrolové vrstvy bude mít pravděpodobně na polymeraci pyrrolu vliv materiál, ze kterého jsou vlákna vyrobena. Po vytvoření povrchové vrstvy na

elektrostaticky zvlákněných materiálech byl okem pozorovatelný rozdíl mezi barvou polypyrrolové vrstvy na vláknech PCL a PLCL – vrstva na PLCL vláknech byla světlejší (viz obrázek 7-2).



Obrázek 7-2: Vrstva polypyrrolu na vláknech PCL (tmavší, vlevo) a na vláknech PLCL (světlejší, vpravo) vyrobené za stejných podmínek.

8 In vitro testy

Tato práce navazuje na bakalářskou práci Krabicová (2015), kde byla zkoumána cytokompatibilita PCL vláken s povrchovou vrstvou polypyrrolu s myšími fibroblasty (3T3). Dalším krokem bylo testování na lidských buňkách, což bylo provedeno v rámci této diplomové práce. Použitými metodami byly MTT test a fluorescenční mikroskopie. Byly provedeny dva in vitro testy s buňkami NHDF, kde se neprokázal výrazný rozdíl mezi testovanými materiály. Došlo ke změně ve 2 faktorech, jež by mohly mít na testování vliv (buněčná linie a způsob sterilizace), proto byl proveden ještě třetí test. V něm je opět použita sterilizace ethanolem a myší fibroblasty. V posledním testu bylo cílem zjistit cytokompatibilitu vláken vyrobených z jiného polymeru a zároveň objasnit, zda má materiál, ze kterého jsou vlákna vyrobena, vliv na vlastnosti polypyrrolové vrstvy a její cytokompatibilitu. Proto byla pro porovnání současně testována vlákna PCL a PLCL.

8.1 Orientovaná vlákna (drawing) + lidské dermální fibroblasty

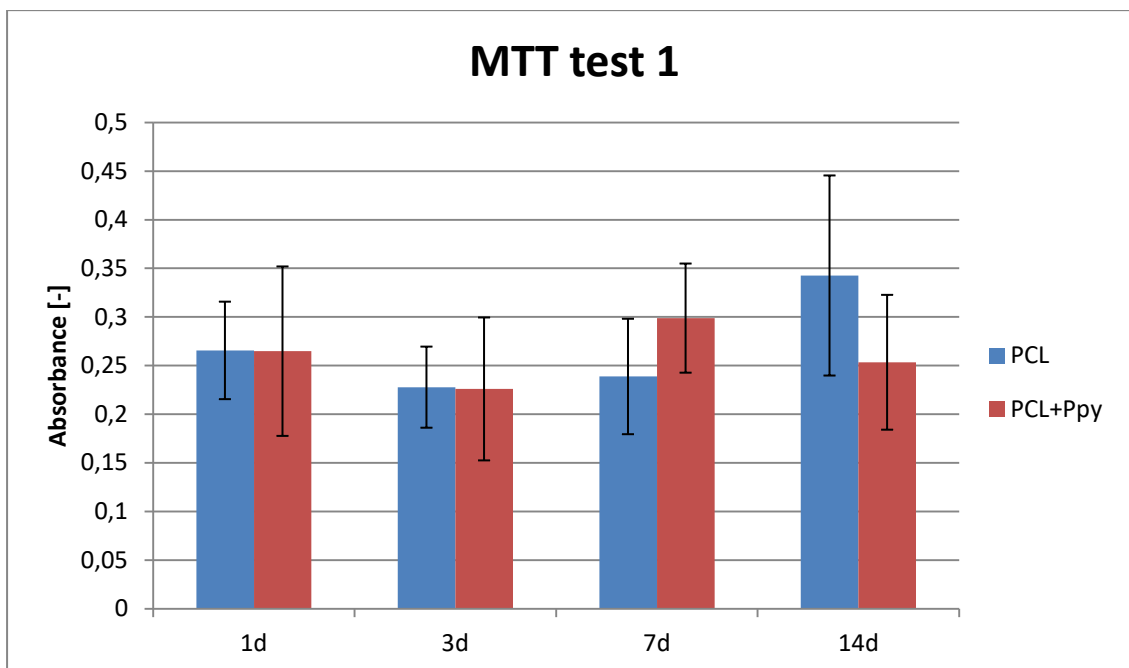
V rámci práce byly provedeny dva in vitro testy s buňkami NHDF. První pokus byl naplánován na 14 dní. Jelikož materiály v prvním experimentu nebyly po 14 dnech kultivace zcela porostlé buňkami, byl druhý experiment naplánován na 21 dní. V obou případech byla vlákna sterilizována etylenoxidem a poté týden odvětrávána, aby se odstranila případná rezidua etylenoxidu.

U prvního pokusu byly vzorky 4. den přesunuty do nových destiček bez buněk přisedlých na dno. U druhého pokusu byly vzorky přesunuty do nových destiček již první testovací den, kdy by buňky již měly být adherované na materiálu.

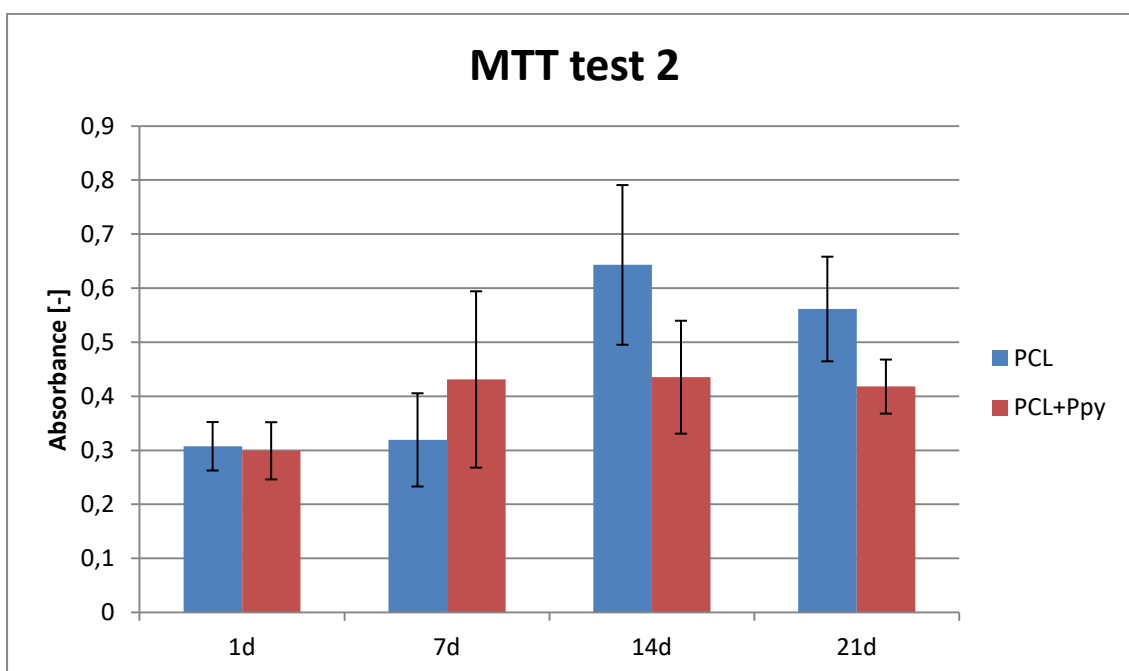
8.1.1 MTT test

MTT test byl proveden podle protokolu uvedeného v kapitole 5.4.5. Inkubační doba byla v obou testech 3 hodiny.

Během prvního testování bylo v každém ze 4 testovacích dnů použito od každého materiálu 5 vzorků osazených buňkami NHDF a jeden neosazený (NC). Výsledky jsou vyneseny v grafu 8-1.



Graf 8-1: Porovnání absorbance roztoku formazanu u orientovaných vláken s vrstvou polypyrrolu a bez ní při prvním in vitro testování s buňkami NHDF. Hodnota absorbance je úměrná viabilitě buněk.



Graf 8-2: Porovnání absorbance roztoku formazanu u orientovaných vláken s vrstvou polypyrrolu a bez ní při druhém in vitro testování s buňkami NHDF. Hodnota absorbance je úměrná viabilitě buněk.

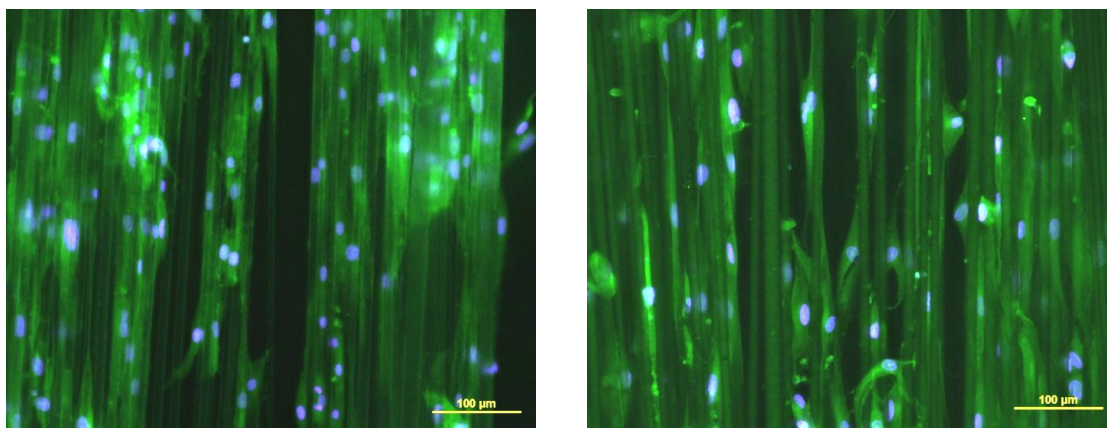
V obou experimentech nelze říci, že by byl některý z materiálů pro růst buněk vhodnější. Rozdíly mezi absorbancemi jsou u obou testů v rámci směrodatných odchylek.

Absorbance první testovací den vypovídá o adhezi buněk na materiál. Pokles absorbance po 14, resp. 21 dnech od nasazení pokusu může být způsobeno i tím, že buňky již kompletně porostly vlákna a tím byl zpomalen jejich růst i metabolické procesy.

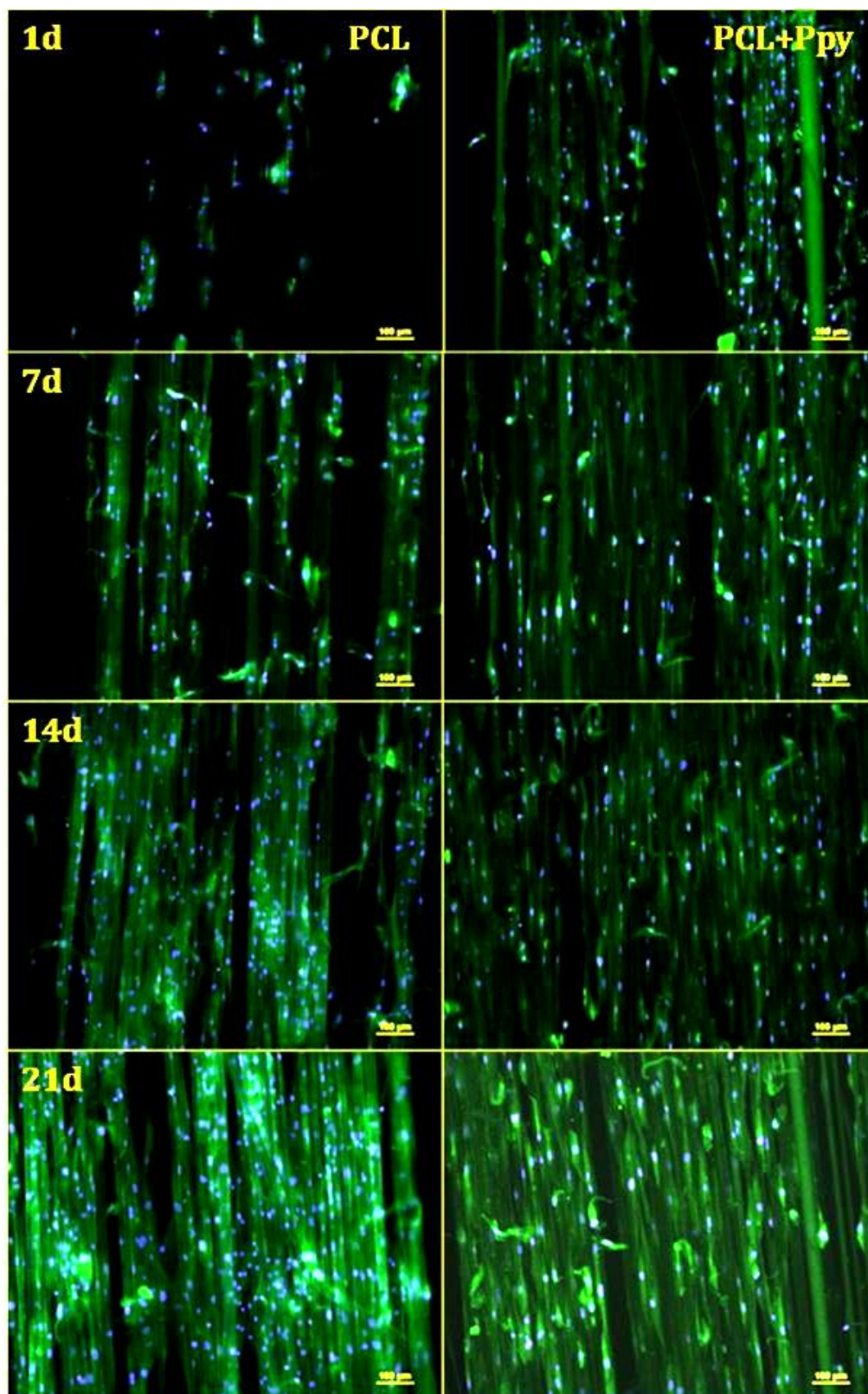
8.1.2 Fluorescenční mikroskopie

Příprava vzorků na sledování pomocí fluorescenční mikroskopie proběhla podle protokolu (viz 5.4.6). Každý testovací den byl zkoumán jeden vzorek od každého materiálu. K porovnání fotografií byly použity snímky z experimentu trvajících 21 dní (obrázek 8-2), snímky ze 14 - denního experimentu jsou k nahlédnutí v příloze.

Na snímcích z prvního dne (obrázek 8-2) můžeme porovnat adhezi buněk na jednotlivé materiály. Z fotografií je patrné, že buňky lépe adherují na vlákna potažená polypyrrolem. Na snímcích z dalších testovacích dnů lze porovnat proliferaci a morfologii buněk. Je zřejmé morfologie buněk je jiná na vláknech s vrstvou polypyrrolu a bez ní (viz obrázek 8-1). Na vláknech s polypyrrolem jsou buňky větší, jsou protažené a kopírují orientaci vláken.



Obrázek 8-1: Snímky fluorescenční mikroskopie při druhém testování. Buňky NHDF na orientovaných vláknech PCL (vlevo) a na orientovaných vláknech PCL s vrstvou polypyrrolu (vpravo) po 14 dnech kultivace. Měřítka odpovídá 100 µm.



Obrázek 8-2: Snímky z fluorescenční mikroskopie orientovaných vláken s buňkami NHDF pořízené při druhém testování in vitro. Buňky byly obarveny DAPI (modré barvivo, buněčná jádra) a phalloidinem-FITC (zelená, aktinová vlákna). Měřítka odpovídá 100 μm . V řádcích jsou testovací dny (1., 7., 14., 21.) a ve sloupcích materiály (PCL, PCL+Ppy).

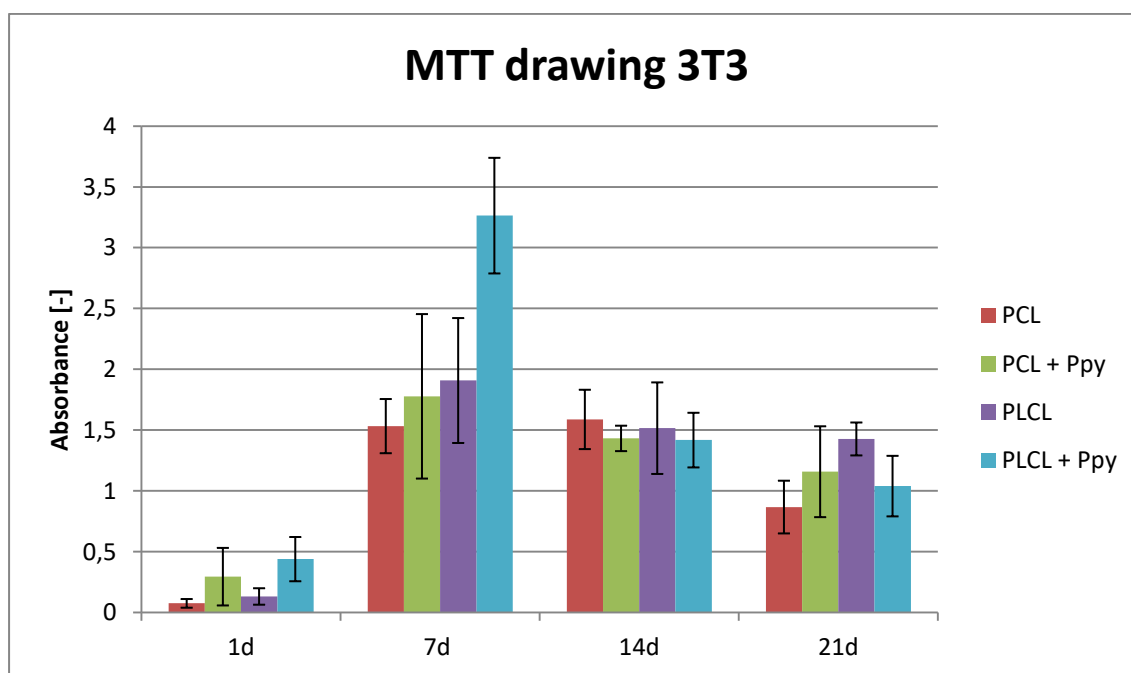
8.2 Orientovaná vlákna (drawing) + 3T3 myší fibroblasty

V této sérii testů byla mezi sebou porovnávána vlákna vyrobená metodou drawing, a sice ve čtyřech variantách – PCL, PCL s vrstvou polypyrrolu (PCL + Ppy), PLCL a PLCL s vrstvou polypyrrolu (PLCL + Ppy). Cílem bylo porovnat vliv materiálu, ze kterého jsou vlákna vyrobena, a zda má na růst buněk vliv, i když je potažen polypyrrolem.

Vlákna byla sterilizována ethanolem. Ke každému vzorku ve 24-jamkové kultivační destičce bylo přidáno 10^5 buněk. První testovací den byly vzorky přesunuty do nových destiček, aby buňky přisedly na dno neovlivňovaly ty, jež adherovaly na vlákna.

8.2.1 MTT test

MTT test proběhl dle protokolu 5.4.5 s dobou inkubace 3 hodiny. Od každého vzorku byly použity 4 vzorky osazené buňkami 3T3 (myší fibroblasty) a 1 vzorek neosazený (NC). Výsledná absorbance po odečtení negativní kontroly (vlivu vláken) je vynesena v grafu 8-3.



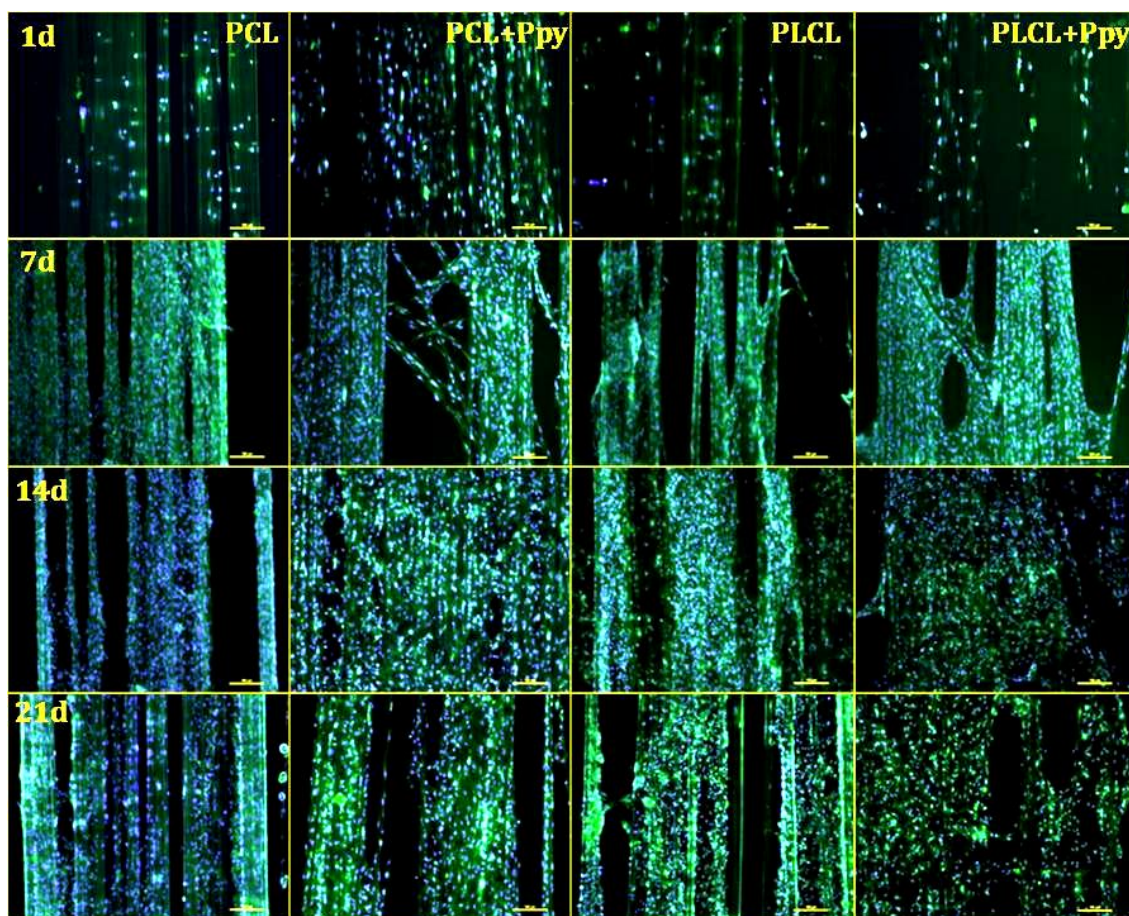
Graf 8-3: Výsledek MTT testu pro orientovaná vlákna s 3T3 myšími fibroblasty.

Rozdíly mezi porovnávanými materiály opět nelze jednoznačně určit, všechny jsou v rámci směrodatných odchylek. Pouze 7. den je výrazný nárůst absorbance u vláken PLCL s vrstvou polypyrrolu. Od 14. dne absorbance u vzorků klesá. To je pravděpodobně

způsobeno kompletním porostem buněk na vláknech, tím se omezila metabolická aktivita buněk. Pokud by došlo k opakování tohoto testu, bylo by vhodné zvolit kratší časový úsek nebo menší násadu buněk.

8.2.2 Fluorescenční mikroskopie

Vzorky byly na fluorescenční mikroskopii připraveny dle protokolu 5.4.6.



Obrázek 8-3: Snímky z fluorescenční mikroskopie vláken vyrobených metodou drawing s buňkami 3T3. Ve sloupcích jsou seřazené materiály (PCL, PCL + polypyrrol, PLCL, PLCL + polypyrrol), v řádcích jednotlivé testovací dny (1., 7., 14., 21. den). Měřítko odpovídá 100 μm . Barvení DAPI (modrá, jádra), phalloidin – FITC (zelená, aktinová vlákna).

Na obrázku 8-3 můžeme porovnat adhezi a růst buněk na orientovaných vláknech z různých materiálů (PCL, PCL + polypyrrol, PLCL, PLCL + polypyrrol). Na snímcích z 1. dne lze porovnat adhezi buněk na jednotlivé materiály, lepší výsledky vykazovala vlákna s povrchovou vrstvou polypyrrolu. Od 7. do 21. dne můžeme porovnat růst buněk na vláknech. Již 7. den byla vlákna silně porostlá buňkami, které jednotlivá vlákna spojovala

do snopců. Po 14-21 dnech byly buňkami přerostlé i jednotlivé snopečky a vzorky byly kompletně porostlé. To odpovídá výsledkům MTT testu – buňky již nemají kam proliferovat a dochází k útlumu metabolismu. Vzhledem k velikosti a tvaru buněk nebyla vidět rozdílná morfologie buněk jako v případě lidských dermálních fibroblastů (NHDF), stejně tak nelze dobře sledovat orientaci buněk podle směru vláken.

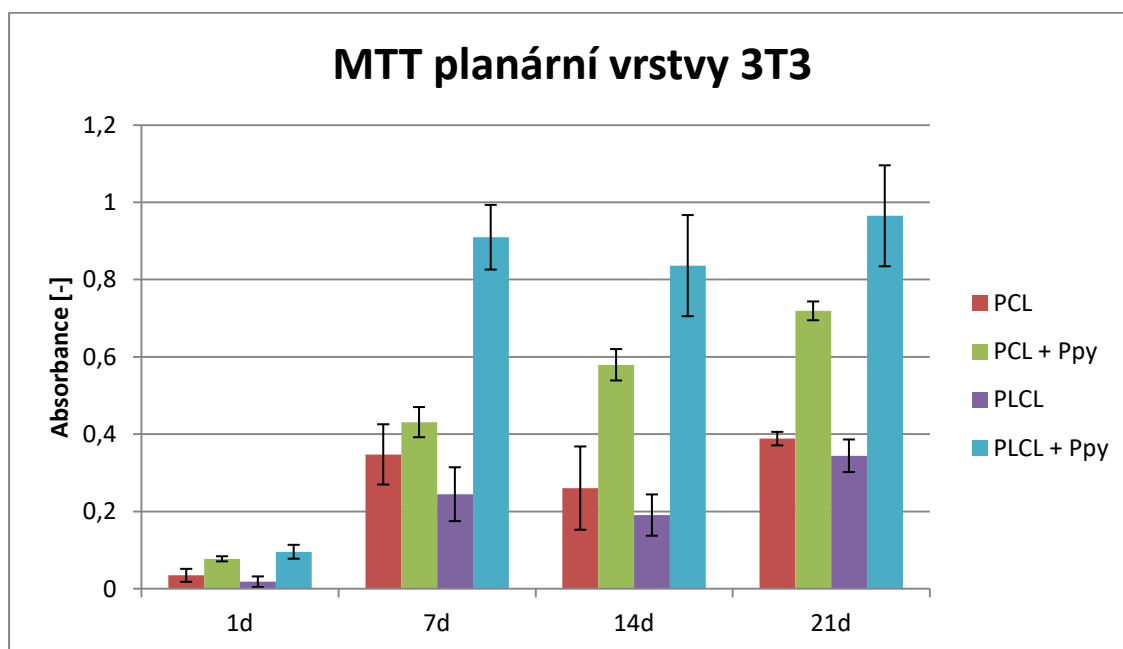
8.3 Mikrovlákna (elektrospinning) + 3T3

Aby bylo možné porovnat chování buněk na orientovaných a neorientovaných vláknech podobných rozměrů, byly zároveň s jednotlivými orientovanými vlákny testovány i mikrovláknenné vzorky vyrobené metodou elektrospinning. Opět byly použity 4 typy materiálů: PCL, PCL + polypyrrol, PLCL, PLCL + polypyrrol.

Vzorky pro in vitro testy velikostí odpovídaly jamkám v 96-jamkové kultivační destičce, sterilizovány byly opět ethanolem.

8.3.1 MTT test

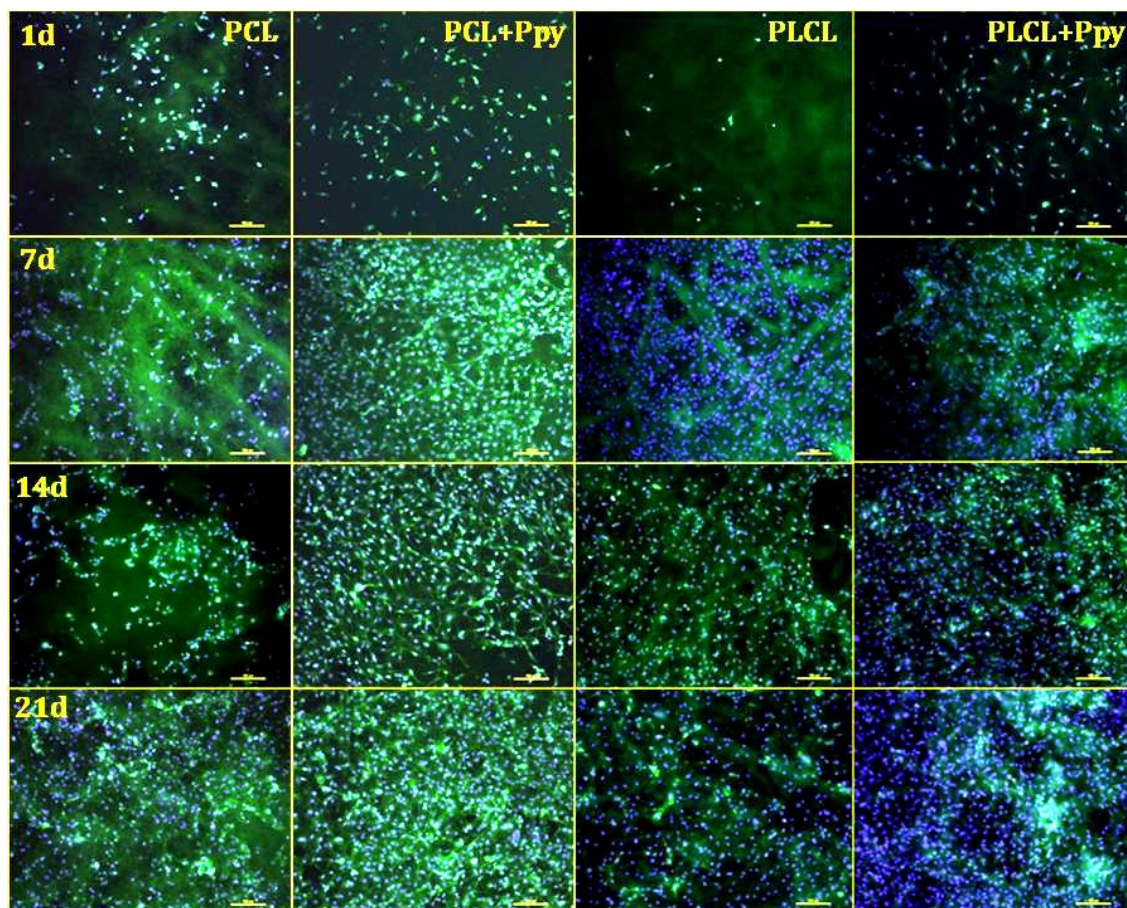
MTT test byl proveden dle protokolu 5.4.55.4.5, doba inkubace byla 3 hodiny. Výsledky jsou shrnuty v grafu 8-4.



Graf 8-4: MTT test pro planární vrstvy náhodně orientovaných mikrovláken s 3T3 myšními fibroblasty.

V případě vrstev mikrovláken lze pozorovat výrazně vyšší proliferaci buněk u materiálů opatřených vrstvou polypyrrolu, nejlepší výsledky vykazuje PLCL s polypyrrolem. Během tohoto testu bylo pravděpodobně lépe odhadnuté množství buněk na plochu vzorku, proto ani po 21 dnech nedochází k poklesu absorbance.

8.3.2 Fluorescenční mikroskopie



Obrázek 8-4: Snímky z fluorescenční mikroskopie mikrovláčkových vrstev s 3T3 myšími fibrobrasty. Ve sloupcích jsou seřazené materiály (PCL, PCL + polypyrrol, PLCL, PLCL + polypyrrol), v řádcích jednotlivé testovací dny (1., 7., 14., 21. den). Měřítka odpovídá 100 μm . Barvení DAPI (modrá, jádra), phalloidin – FITC (zelená, aktinová vlákna).

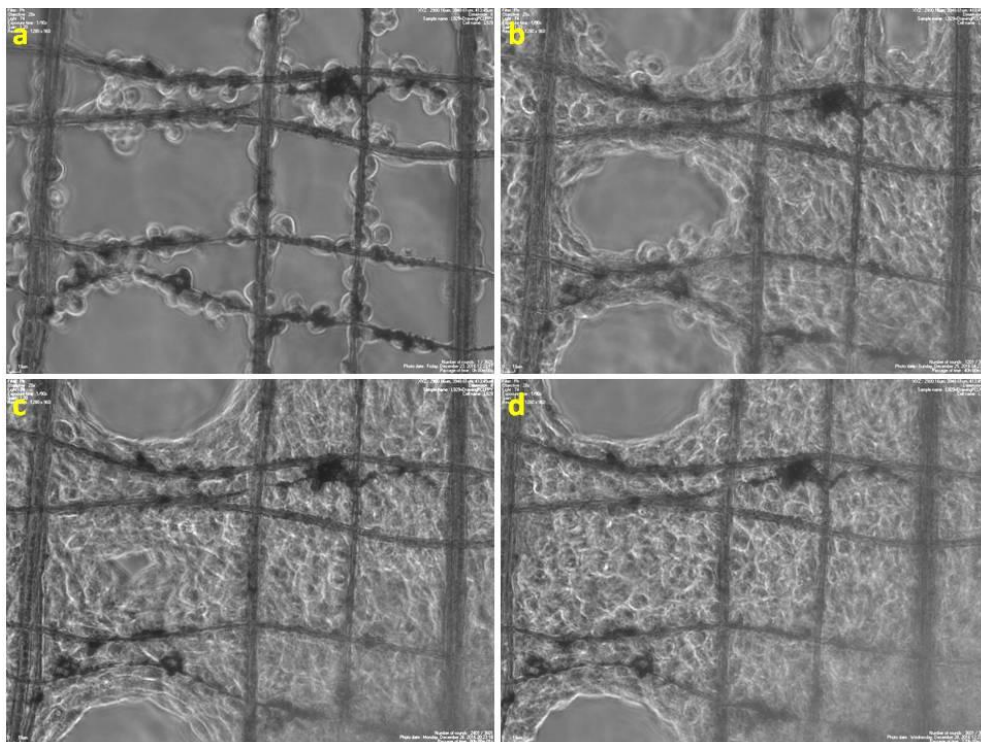
Obrázek 8-4 ukazuje porovnání mezi čtyřmi testovanými materiály (PCL, PCL + polypyrrol, PLCL, PLCL + polypyrrol) tentokrát ve formě vrstev náhodně orientovaných mikrovláken. Na snímcích z 1. dne vidíme, že nejlépe buňky adherovaly na materiály s vrstvou polypyrrolu. Samotná PCL a PLCL vlákna byla porostlá v nepravidelných ostrůvcích, nejhorší byly výsledky v případě kopolymeru PLCL. I pro další růst buněk byly vhodnější materiály s polypyrrolem, bez něj byl růst pomalejší a ve

shlucích. Po 21 dnech bylo buněk na materiálech s polypyrrolem výrazně více, než na PCL a PLCL vláknech. Samotná vlákna však často zeleně fluoreskovala, což může zkreslovat dojem o množství buněk na pořízených fotografiích.

8.4 Live cell imaging

Ve spolupráci s laboratoří tkáňových kultur v Nových Hradech (FROV, JU) byly vlákenné materiály zkoumané v této práci podrobeny také experimentům časosběrné mikroskopie. Na vlákna byly nasazeny buňky NHDF a kultivace probíhala v zařízení BioStation (Nikon). To umožňuje inkubaci buněk a zároveň pravidelné pořizování snímků optickým mikroskopem. Z pořízených záběrů lze sledovat chování buněk v čase – jejich morfologii, lokomoci, dělení, rychlost zarůstání vlákenné mřížky, apod.

Ukázalo se, že jednotlivá vlákna vyrobená metodou drawing jsou pro tuto metodu zkoumání buněk ideální. Dá se sledovat, jak buňky po vláknech migrují a dělí se. Vlákenné vrstvy nejsou pro tyto účely vhodné, jelikož materiál většinou není průhledný ani dostatečně porézní, tudíž se dají buňky sledovat jen v okolí materiálu (resp. na hraně materiálu).



Obrázek 8-5: Ukázka z časosběrné mikroskopie – buňky NHDF na mřížce PCL s vrstvou polypyrrolu vyrobené metodou drawing: (a) při umístění do inkubátoru (0 h); (b) po 40 h inkubace; (c) po 80 h inkubace; (d) po 120 h inkubace.

Závěr

Cílem práce bylo vyrobit a charakterizovat vlákenný materiál a otestovat, zda je vhodný jako nosič pro tkáňové inženýrství. K testování byla použita jednotlivá orientovaná vlákna vyrobená metodou tažení vláken z kapky polymeru (drawing).

První část práce se zabývá výrobou vlákenného materiálu metodou drawing a jeho charakteristikou. Byly v ní popsány vlastnosti roztoku použitého k výrobě PCL vláken (viskozita a povrchové napětí), aby bylo možné odhadovat parametry roztoku při použití jiného polymeru. Dále byla popsána morfologie vznikajících vláken, jejich mechanické vlastnosti (pevnost v tahu) a degradační chování. Metodou drawing vznikají při použitých podmínkách tažení mikroválka, při jejich následném potažení vrstvou polypyrrolu je změna průměru vláken zanedbatelná. Odlišnosti průměru vláken jsou způsobeny spíše výrobním procesem, nežli povrchovou vrstvou, což se prokázalo při měření průměrů vláken na vrstvách vyrobených metodou elektrospinning. Při zkoumání pevnosti v tahu bylo zjištěno, že při namáhání vláken dochází k jejich několikanásobnému protažení. Měření probíhalo při malých rychlostech a pravděpodobně docházelo k dloužení vláken. Vzhledem k detekčnímu rozsahu přístroje nebylo možné zkoušet pevnost jednoho samostatného vlákna, ale bylo nutné použít svazek vláken. Při sledování degradačního chování PCL vláken byly použity tři koncentrace roztoku lipázy. Na vláknech vznikaly působením enzymu trhliny a docházelo postupně k erozi povrchu vlákenko mozaikové struktury. Působením nejvyšší koncentrace enzymu došlo k úplné degradaci vláken již v polovině experimentu, pro další testování degradace materiálu byla proto navržena nižší koncentrace lipázy.

Vlákna byla modifikována povrchovou vrstvou polypyrrolu. Z literatury vyplývá, že použití vodivého polymeru podporuje buněčný růst a je vhodné pro použití v oblasti regenerace nervové tkáně. Na jednotlivých vláknech se však nepodařilo vodivost polypyrrolu ověřit. Vrstva byla pravděpodobně příliš tenká a měřicí přístroj neměl dostatečnou citlivost. Proto by mělo být měření opakováno se silnější vrstvou polypyrrolu na planární vrstvě a s citlivějším měřicím přístrojem.

Druhá část práce se zabývá testováním modifikovaných vláken při aplikaci jako substrát pro růst buněk. Pro vyhodnocení byl použit metabolický test viability buněk MTT a fluorescenční mikroskopie. Nejprve byla vhodnost aplikace testována na buněčné linii lidských dermálních fibroblastů (NHDF). Tyto buňky byly zvoleny kvůli své velikosti a tvaru, jelikož na nich lze dobře pozorovat jejich morfologie a tendence kopírovat orientaci

vláken. Tento předpoklad se potvrdil, skutečně šlo sledovat, jak buňky ochotně kopírují orientaci vláken a na vláknech s polypyrrolem a bez něj byly vidět rozdíly v morfologii buněk. Protože v MTT testu docházelo k poměrně rychlému útlumu metabolické aktivity buněk, byl naplánován experiment s 3T3 myšimi fibroblasty. V tomto experimentu byl sledován rozdíl v chování buněk na jednotlivých orientovaných vláknech a vrstvách a také byl zkoumán vliv materiálu pod vrstvou polypyrrolu. K porovnání byla použita vlákna PCL a PLCL jak v podobě orientovaných vláken vyrobených metodou drawing, tak v podobě vlákenné vrstvy vyrobené elektrostatickým zvlákňováním. Ukázalo se, že materiál, ze kterého jsou vlákna vyrobena, má pravděpodobně vliv na vlastnosti polypyrrolové vrstvy. Nejvíce proliferovaly buňky na PLCL vláknech s vrstvou polypyrrolu jak v případě orientovaných, tak náhodně uspořádaných vláken.

Dalšími kroky v tomto výzkumu by měly být in vitro testy s nervovými (popř. kmenovými) buňkami a testování vhodného hydrogelu a nosiče jako celku. Vhodným pokračováním by mohly být i experimenty s elektrickou stimulací buněk a funkcionalizace polypyrrolové vrstvy vhodnými látkami (např. navázání nervových růstových faktorů), jež by podpořily adhezi a proliferaci buněk. Dalším krokem by bylo testování vlákenných nosičů in vivo. Také bude potřeba hlouběji charakterizovat materiál a jeho chování, např. jeho mechanické vlastnosti spojit se stupněm krystalinity materiálu, zopakovat testy degradačního chování a optimalizovat proces vzniku vrstvy polypyrrolu, aby nedocházelo k tvorbě defektů.

Seznam literatury

ANON., 2011. *Neuron Diagram & Types / ASU - Ask A Biologist* [online] [vid. 2017-05-08]. Dostupné z: <https://askabiologist.asu.edu/neuron-anatomy>

ANON., 2017. About Spinal Cord Injury. *Spinal Cord Injury BC* [online]. [vid. 2017-03-30]. Dostupné z: <http://sci-bc.ca/resource-centre/spinal-cord-injury/>

ANON., nedatováno. Biologické vědy a nervová soustava «E-learningová podpora mezioborové integrace výuky tématu vědomí na UP Olomouc [online]. [vid. 2016-12-29]. Dostupné z: <http://pfyziolffup.upol.cz/castwiki/?p=845>

BAJÁKOVÁ, Jana, Jiří CHALOUPEK, David LUKÁŠ a Maxime LACARIN, 2011. „DRAWING“-THE PRODUCTION OF INDIVIDUAL NANOFIBERS BY EXPERIMENTAL METHOD. In: *Nanocon* [online]. Dostupné z: http://nanocon2013.tanger.cz/files/proceedings/nanocon_11/lists/papers/1140.pdf

BARNES, Catherine P., Scott A. SELL, Eugene D. BOLAND, David G. SIMPSON a Gary L. BOWLIN, 2007. Nanofiber technology: Designing the next generation of tissue engineering scaffolds. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. **59**(14), 1413–1433. ISSN 0169409X. Dostupné z: doi:10.1016/j.addr.2007.04.022

BHARDWAJ, Nandana a Subhas C. KUNDU, 2010. Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique. *Biotechnology Advances* [online]. **28**(3), 325–347. ISSN 07349750. Dostupné z: doi:10.1016/j.biotechadv.2010.01.004

BOSWORTH, Lucy A., Lesley-Anne TURNER a Sarah H. CARTMELL, 2013. State of the art composites comprising electrospun fibres coupled with hydrogels: a review. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* [online]. **9**(3), 322–335. ISSN 15499634. Dostupné z: doi:10.1016/j.nano.2012.10.008

BRODWIN, Martin G, 2009. *Medical, psychosocial, and vocational aspects of disability*. Athens, GA: Elliott & Fitzpatrick. ISBN 978-0-9798786-5-7.

BUTCHER, Annabel L., Giovanni S. OFFEDDU a Michelle L. OYEN, 2014. Nanofibrous hydrogel composites as mechanically robust tissue engineering scaffolds. *Trends in Biotechnology* [online]. **32**(11), 564–570. ISSN 01677799. Dostupné z: doi:10.1016/j.tibtech.2014.09.001

COULEMBIER, Olivier, Philippe DEGÉE, James L. HEDRICK a Philippe DUBOIS, 2006. From controlled ring-opening polymerization to biodegradable aliphatic polyester: Especially poly(β -malic acid) derivatives. *Progress in Polymer Science* [online]. **31**(8), 723–747. ISSN 00796700. Dostupné z: doi:10.1016/j.progpolymsci.2006.08.004

ČIHÁK, Radomír, Miloš GRIM, Rastislav DRUGA, Milan MED a Ivan HELEKAL, 2001. *Anatomie*. Praha: Grada. ISBN 978-80-7169-970-5.

FERNÁNDEZ, J., E. MEAURIO, A. CHAOS, A. ETXEBERRIA, A. ALONSO-VARONA a J.R. SARASUA, 2013. Synthesis and characterization of poly (l-lactide/ ϵ -caprolactone) statistical copolymers with well resolved chain microstructures. *Polymer* [online]. **54**(11), 2621–2631. ISSN 00323861. Dostupné z: doi:10.1016/j.polymer.2013.03.009

FERNÁNDEZ, Jorge, Agustin ETXEBERRIA a Jose-Ramon SARASUA, 2012. Synthesis, structure and properties of poly(L-lactide-co--caprolactone) statistical copolymers.

Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials [online]. **9**, 100–112. ISSN 17516161. Dostupné z: doi:10.1016/j.jmbbm.2012.01.003

FUJIHARA, K., M. KOTAKI a S. RAMAKRISHNA, 2005. Guided bone regeneration membrane made of polycaprolactone/calcium carbonate composite nano-fibers. *Biomaterials* [online]. **26**(19), 4139–4147. ISSN 01429612. Dostupné z: doi:10.1016/j.biomaterials.2004.09.014

GERARD, M, 2002. Application of conducting polymers to biosensors. *Biosensors and Bioelectronics* [online]. **17**(5), 345–359. ISSN 09565663. Dostupné z: doi:10.1016/S0956-5663(01)00312-8

GUARINO, Vincenzo, Marco Antonio ALVAREZ-PEREZ, Anna BORRIELLO, Teresa NAPOLITANO a Luigi AMBROSIO, 2013. Conductive PANi/PEGDA Macroporous Hydrogels For Nerve Regeneration. *Advanced Healthcare Materials* [online]. **2**(1), 218–227. ISSN 21922640. Dostupné z: doi:10.1002/adhm.201200152

GUIMARD, Nathalie K., Natalia GOMEZ a Christine E. SCHMIDT, 2007. Conducting polymers in biomedical engineering. *Progress in Polymer Science* [online]. **32**(8–9), 876–921. ISSN 00796700. Dostupné z: doi:10.1016/j.progpolymsci.2007.05.012

HAVLÍČKOVÁ, Veronika, 2014. *Testování biologických vlastností vláknenných nosičů*. Liberec. Diplomová práce. Technická univerzita v Liberci.

HAYASHI, Toshio, 1994. Biodegradable polymers for biomedical uses. *Progress in Polymer Science* [online]. **19**(4), 663–702. ISSN 00796700. Dostupné z: doi:10.1016/0079-6700(94)90030-2

HOLIBKOVÁ, Alžběta, Stanislav LAICHMAN, UNIVERZITA PALACKÉHO a LÉKAŘSKÁ FAKULTA, 2006. *Přehled anatomie člověka*. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci. ISBN 978-80-244-1480-5.

JIN, Jenny, Sonja LIMBURG, Sunil K. JOSHI, Rebeccah LANDMAN, Michelle PARK, Qia ZHANG, Hubert T. KIM a Alfred C. KUO, 2013. Peripheral Nerve Repair in Rats Using Composite Hydrogel-Filled Aligned Nanofiber Conduits with Incorporated Nerve Growth Factor. *Tissue Engineering Part A* [online]. **19**(19–20), 2138–2146. ISSN 1937-3341, 1937-335X. Dostupné z: doi:10.1089/ten.tea.2012.0575

KRABICOVÁ, Ilona, 2015. *Příprava tkáňového nosiče pro náhradu nervové tkáně (míšň léze)*. Liberec. Bakalářská práce. Technická univerzita v Liberci.

LEE, Jae Y., Chris A. BASHUR, Aaron S. GOLDSTEIN a Christine E. SCHMIDT, 2009. Polypyrrole-coated electrospun PLGA nanofibers for neural tissue applications. *Biomaterials* [online]. **30**(26), 4325–4335. ISSN 01429612. Dostupné z: doi:10.1016/j.biomaterials.2009.04.042

MORADI, Fateme, Mehrdad BAHKTIARI, Mohammad Taghi JOGHATAEI, Maliheh NOBAKHT, Masoud SOLEIMANI, Gholamreza HASANZADEH, Ali FALLAH, Sam ZARBAKHSH, Leila Beigom HEJAZIAN, Maryam SHIRMOHAMMADI a Fatemeh MALEKI, 2012. BD PuraMatrix peptide hydrogel as a culture system for human fetal Schwann cells in spinal cord regeneration. *Journal of Neuroscience Research* [online]. **90**(12), 2335–2348. ISSN 03604012. Dostupné z: doi:10.1002/jnr.23120

NAIN, Amrinder S., Joanna C. WONG, Cristina AMON a Metin SITTI, 2006. Drawing suspended polymer micro-/nanofibers using glass micropipettes. *Applied Physics Letters*

[online]. **89**(18), 183105. ISSN 0003-6951, 1077-3118. Dostupné z: doi:10.1063/1.2372694

NAIR, Lakshmi S. a Cato T. LAURENCIN, 2007. Biodegradable polymers as biomaterials. *Progress in Polymer Science* [online]. **32**(8–9), 762–798. ISSN 00796700. Dostupné z: doi:10.1016/j.progpolymsci.2007.05.017

OREL, Miroslav, 2011. Biologické vědy a nervová soustava « E-learningová podpora mezioborové integrace výuky tématu vědomí na UP Olomouc [online]. [vid. 2017-05-09]. Dostupné z: <http://pfyziol.fup.upol.cz/castwiki/?p=845>

SAHNI, Vibhu a John A. KESSLER, 2010. Stem cell therapies for spinal cord injury. *Nature Reviews Neurology* [online]. **6**(7), 363–372. ISSN 1759-4758, 1759-4766. Dostupné z: doi:10.1038/nrneurol.2010.73

SILL, Travis J. a Horst A. VON RECUM, 2008. Electrospinning: Applications in drug delivery and tissue engineering. *Biomaterials* [online]. **29**(13), 1989–2006. ISSN 01429612. Dostupné z: doi:10.1016/j.biomaterials.2008.01.011

SILVA, Nuno A., Nuno SOUSA, Rui L. REIS a António J. SALGADO, 2014. From basics to clinical: A comprehensive review on spinal cord injury. *Progress in Neurobiology* [online]. **114**, 25–57. ISSN 03010082. Dostupné z: doi:10.1016/j.pneurobio.2013.11.002

SLAUGHTER, Brandon V., Shahana S. KHURSHID, Omar Z. FISHER, Ali KHADEMHOSEINI a Nicholas A. PEPPAS, 2009. Hydrogels in Regenerative Medicine. *Advanced Materials* [online]. **21**(32–33), 3307–3329. ISSN 09359648, 15214095. Dostupné z: doi:10.1002/adma.200802106

SMITH, L.A. a P.X. MA, 2004. Nano-fibrous scaffolds for tissue engineering. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* [online]. **39**(3), 125–131. ISSN 09277765. Dostupné z: doi:10.1016/j.colsurfb.2003.12.004

STANISLAV, Lukáš, 2012. Dloužení nanovláken z kapky polymeru na mikromanipulátoru. In: *Workshop Světlanka*.

STANISLAV, Lukáš a Jana BAJÁKOVÁ, 2013. Multicomponent nano-yarns production device. In: *Nanocon*.

SUBBIAH, Thandavamoorthy, G. S. BHAT, R. W. TOCK, S. PARAMESWARAN a S. S. RAMKUMAR, 2005. Electrospinning of nanofibers. *Journal of Applied Polymer Science* [online]. **96**(2), 557–569. ISSN 0021-8995, 1097-4628. Dostupné z: doi:10.1002/app.21481

ŠPILKOVÁ, Hana, Eva NOVOSADOVÁ a Kateřina ZIGMUNDOVÁ, 2015. *ELUC* [online] [vid. 2017-05-08]. Dostupné z: <https://eluc.kr-olomoucky.cz/verejne/lekce/2502>

TABESH, H., Gh. AMOABEDINY, N. Salehi NIK, M. HEYDARI, M. YOSEFIFARD, S.O. Ranaei SIADAT a K. MOTTAGHY, 2009. The role of biodegradable engineered scaffolds seeded with Schwann cells for spinal cord regeneration. *Neurochemistry International* [online]. **54**(2), 73–83. ISSN 01970186. Dostupné z: doi:10.1016/j.neuint.2008.11.002

TAN, E.P.S., S.Y. NG a C.T. LIM, 2005. Tensile testing of a single ultrafine polymeric fiber. *Biomaterials* [online]. **26**(13), 1453–1456. ISSN 01429612. Dostupné z: doi:10.1016/j.biomaterials.2004.05.021

THOMAS, Vinoy, Moncy V. JOSE, S. CHOWDHURY, Jonathan F. SULLIVAN, Derrick R. DEAN a Yogesh K. VOHRA, 2006. Mechano-morphological studies of aligned nanofibrous scaffolds of polycaprolactone fabricated by electrospinning. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* [online]. **17**(9), 969–984. ISSN 0920-5063, 1568-5624. Dostupné z: doi:10.1163/156856206778366022

WILLIAMSON, Matthew R. a Allan G.A. COOMBES, 2004. Gravity spinning of polycaprolactone fibres for applications in tissue engineering. *Biomaterials* [online]. **25**(3), 459–465. ISSN 01429612. Dostupné z: doi:10.1016/S0142-9612(03)00536-2

WOODRUFF, Maria Ann a Dietmar Werner HUTMACHER, 2010. The return of a forgotten polymer—Polycaprolactone in the 21st century. *Progress in Polymer Science* [online]. **35**(10), 1217–1256. ISSN 00796700. Dostupné z: doi:10.1016/j.progpolymsci.2010.04.002

YANG, F., R. MURUGAN, S. WANG a S. RAMAKRISHNA, 2005. Electrospinning of nano/micro scale poly(l-lactic acid) aligned fibers and their potential in neural tissue engineering. *Biomaterials* [online]. **26**(15), 2603–2610. ISSN 01429612. Dostupné z: doi:10.1016/j.biomaterials.2004.06.051

YOUNG, Wise, 2017. *Spinal Cord Injury Levels & Classification* [online] [vid. 2017-04-02]. Dostupné z: <http://www.sci-info-pages.com/levels.html>

Přílohy

A Výsledky měření povrchového napětí roztoku

Tabulka A-1: Výsledky měření povrchového napětí 12% roztoku PCL, resp. PLCL v chloroformu

	PCL		PLCL	
	Povrchové napětí [mN/m]	Teplota [°C]	Povrchové napětí [mN/m]	Teplota [°C]
	55,9	24,5	41,3	25,0
	51,1	24,5	39,6	25,0
	50,4	24,5	43,0	24,9
	56,6	25,0	43,3	24,9
	55,6	25,2	42,6	24,9
	56,4	25,2	44,9	24,9
	55,5	25,3	45,4	24,9
	54,6	25,3	37,0	24,8
	54,2	25,3	46,0	24,7
	55,8	25,4	49,6	24,7
	55,9	25,4	49,7	24,7
	57,8	25,4	50,1	24,8
	56,2	25,4	44,4	24,9
	56,8	25,4	51,7	25,0
	56,7	25,4	51,3	25,0
	55,9	25,5	51,9	25,0
	56,2	25,5	52,0	25,0
	53,5	25,5	52,2	25,0
	59,0	25,5	53,1	24,9
	55,5	25,5	53,3	24,9
	60,3	25,4	52,5	24,9
	58,8	25,4	53,0	24,8
	57,9	25,4	53,8	24,7
	60,1	25,4	53,6	24,7
	58,7	25,5	51,6	24,6
	58,1	25,4	52,2	24,7
	56,8	25,4	42,8	24,7

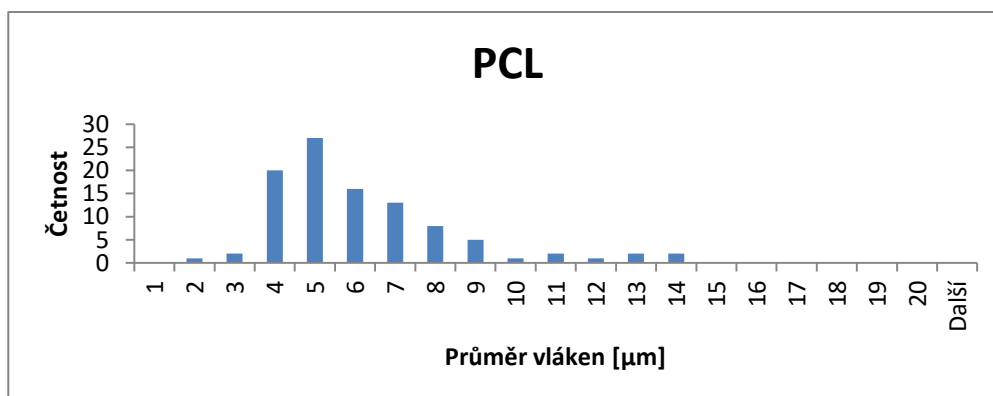
	55,4	25,4	56,3	24,7
	59,2	25,2	56,9	24,7
	56,4	25,2	56,8	24,7
Průměr	56,37667	25,28	49,06333	24,83667
Směrodatná odchylka	2,252307	0,288157	5,391339	0,127261

B Výsledky testování pevnosti v tahu

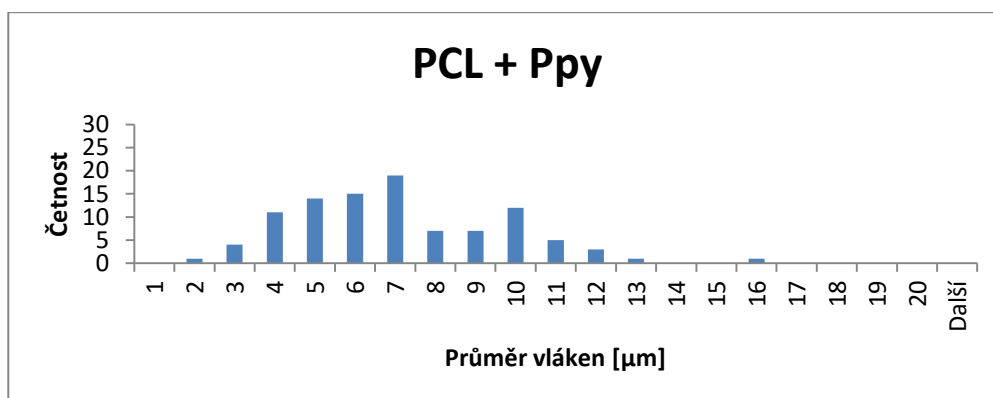
Tabulka B-1: Výsledky testování pevnosti v tahu – maximální síla, prodloužení vláken, relativní prodloužení a pevnost.

Měření č.	F_{\max} [N]	Prodloužení [mm]	Relativní prodloužení [%]	Pevnost [N/tex]	Pevnost [MPa]
1	0,08	101,24	506,20	0,01	15,84
2	0,19	167,06	835,30	0,03	37,62
3	0,28	188,16	940,80	0,05	55,45
4	0,13	147,65	738,25	0,02	25,74
5	0,22	171,57	857,85	0,04	43,56
6	0,11	138,77	693,85	0,02	21,78
7	0,14	137,55	687,75	0,02	27,72
8	0,21	172,67	863,35	0,04	41,58
9	0,08	139,31	696,55	0,01	15,84
10	0,10	77,82	389,10	0,02	19,80
11	0,23	158,31	791,55	0,04	45,55
12	0,18	152,44	762,20	0,03	35,64
Průměr	0,16	146,05	730,23	0,03	32,18
Směrodatná odchylka	0,06	29,72	148,62	0,01	12,37

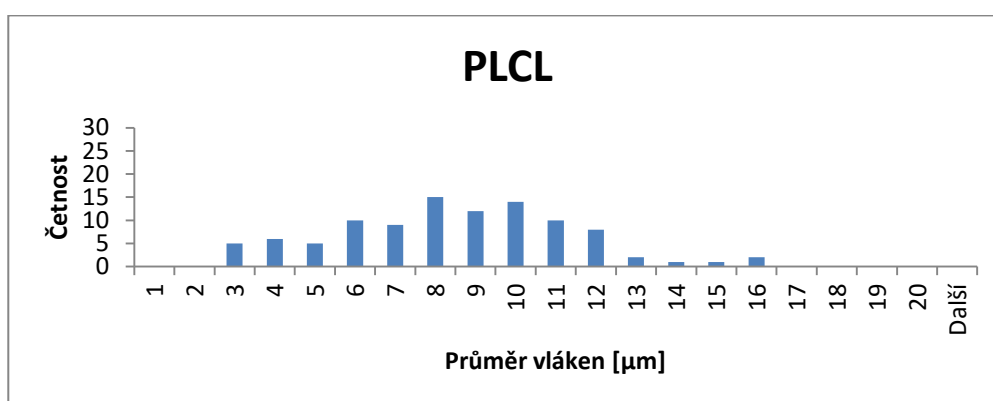
C Morfologie vláken PCL a PLCL vyrobených metodou drawing - histogramy



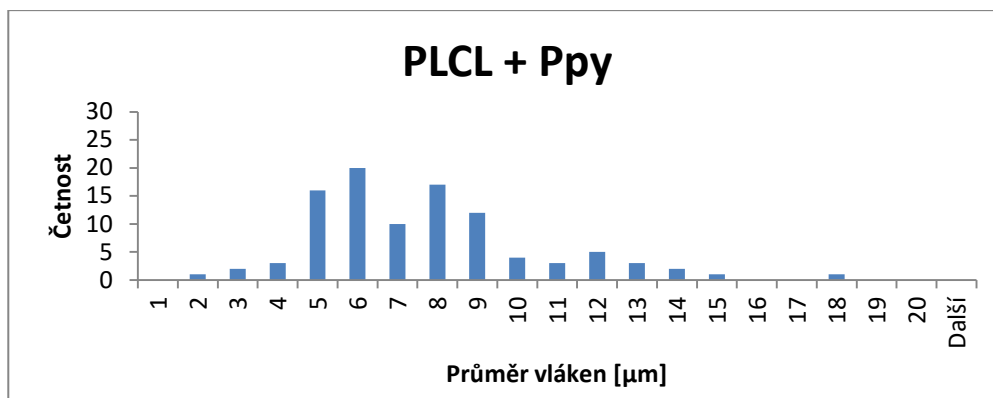
Graf C-1: Histogram četnosti průměrů vláken PCL vyrobených metodou drawing.



Graf C-2: Histogram četnosti průměrů vláken PCL vyrobených metodou drawing s vrstvou polypyrrolu.

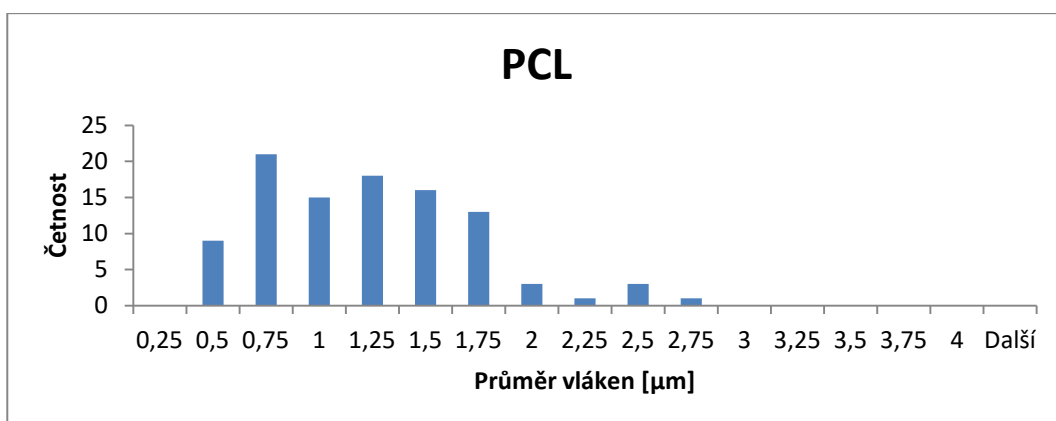


Graf C-3: Histogram průměru PLCL vláken vyrobených metodou drawing.

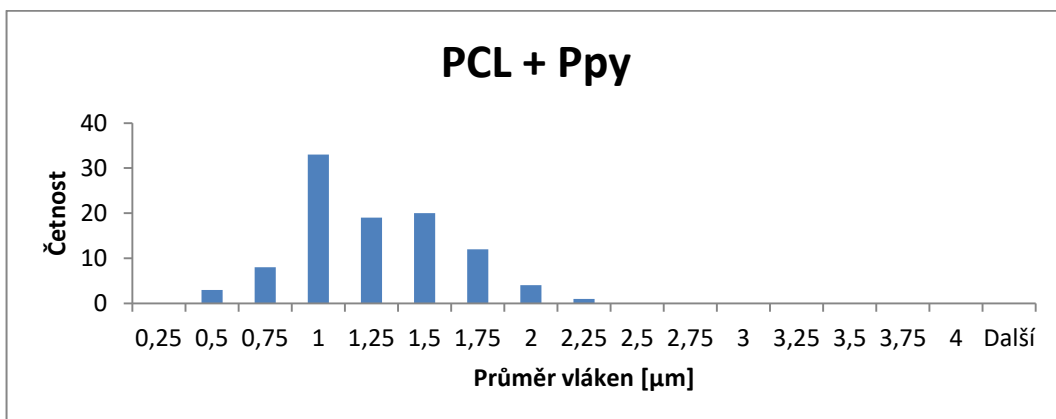


Graf C-4: Histogram průměru vláken PLCL vyrobených metodou drawing a opatřených vrstvou polypyrrolu.

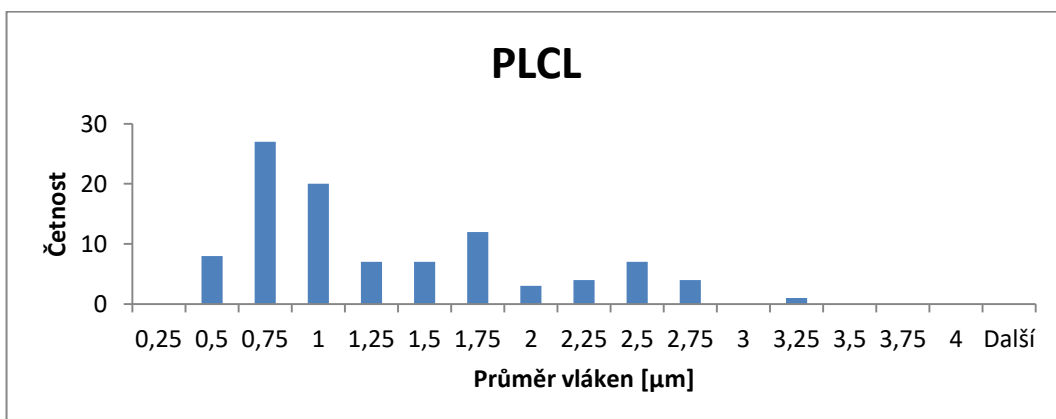
D Morfologie vláknenných vrstev – histogramy



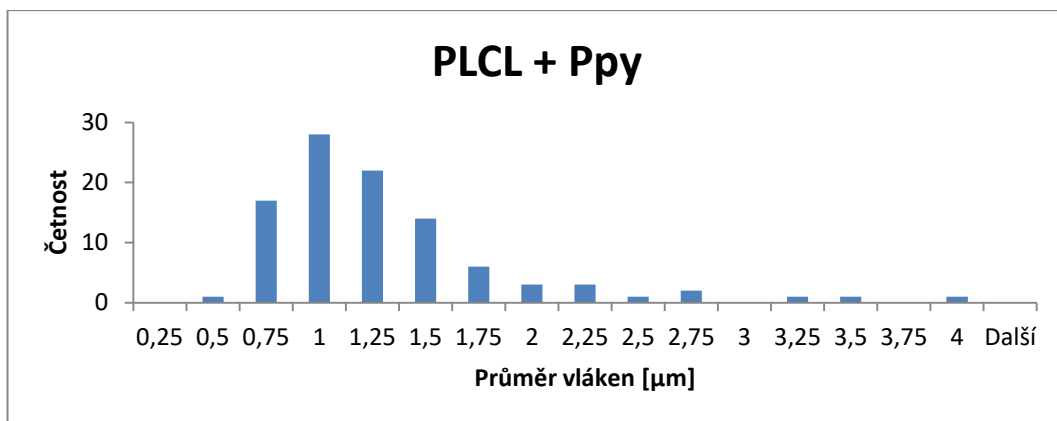
Graf D-1: Histogram průměru PCL vláken vyrobených metodou elektrosponing.



Graf D-2: Histogram průměru PCL vláken vyrobených metodou elektrosponing a opatřených vrstvou polypyrrolu.

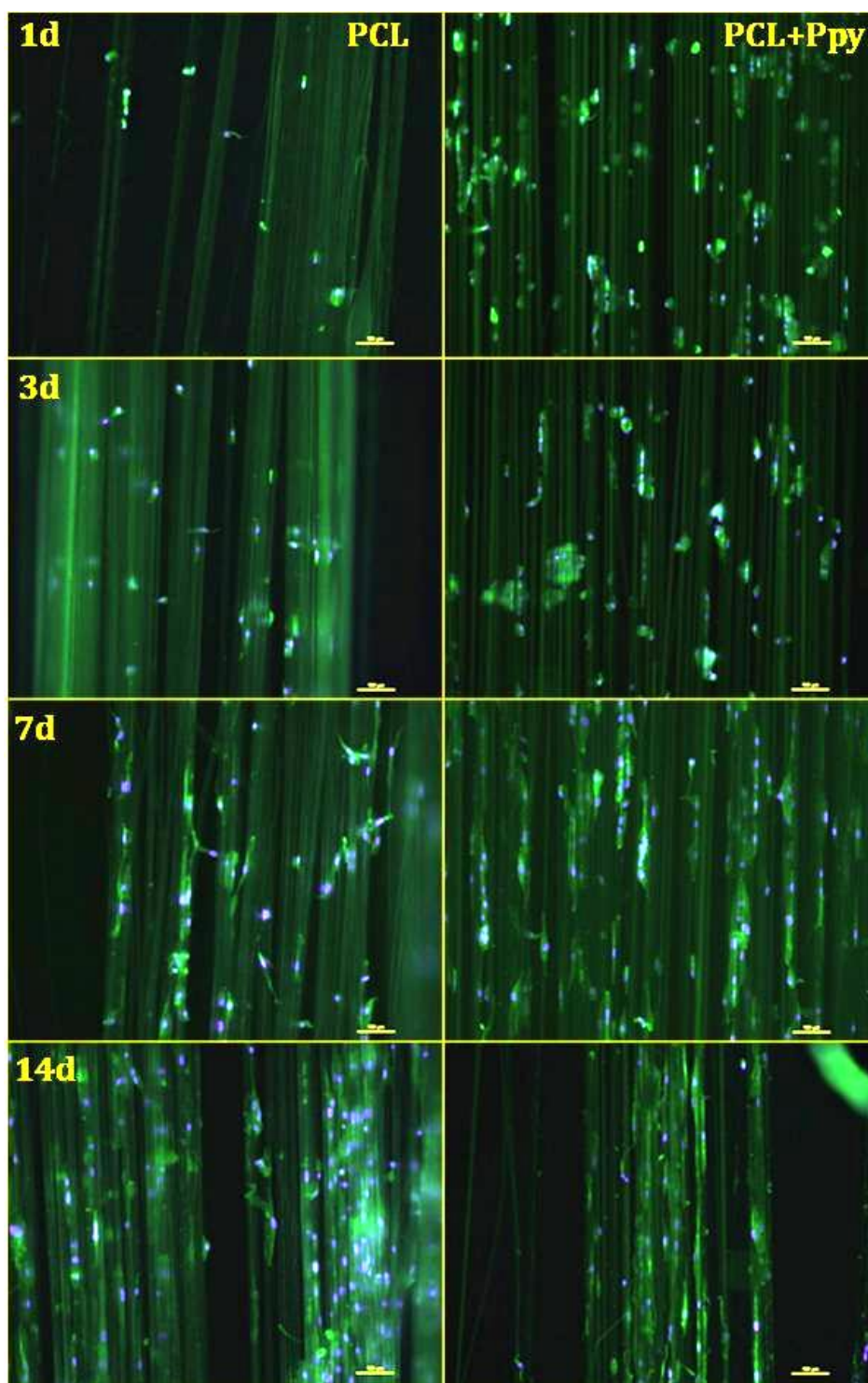


Graf D-3: Histogram průměru PLCL vláken vyrobených metodou elektrosponing.



Graf D-4: Histogram průměru PLCL vláken vyrobených metodou elektrosponing a opatřených vrstvou polypyrrolu.

E Snímky buněk NHDF na jednotlivých orientovaných vláknech



Obrázek E-1: Snímky z fluorescenční mikroskopie orientovaných vláken s buňkami NHDF pořízené při prvním in vitro experimentu. Buňky byly obarveny DAPI (modré barvivo, buněčná jádra) a phalloidinem-FITC (zelená, aktinová vlákna). Měřítka odpovídá 100 μm . V řádcích jsou testovací dny (1., 3., 7., 14.) a ve sloupcích materiály (PCL, PCL+Ppy).

F Obsah přiloženého CD

Text diplomové práce:

DP_Krubicova_2017.pdf

Kompletní data k měření viskozity 12% roztoku PCL v chloroformu:

Viskozita_PCL12_170411.xls